

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄTTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**FGFR3 MUTATION, TUMORANGIOGENESE UND KLINISCHES OUTCOME IN
UROTHELKARZINOMEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Abée

2013

**AUS DEM LEHRSTUHL
FÜR PATHOLOGIE
PROF. DR. FERDINAND HOFSTÄTTER
DER FAKULTÄT FÜR MEDIZIN
DER UNIVERSITÄT REGENSBURG**

**FGFR3 MUTATION, TUMORANGIOGENESE UND KLINISCHES OUTCOME IN
UROTHELKARZINOMEN**

Inaugural – Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

der
Fakultät für Medizin
der Universität Regensburg

vorgelegt von
Christine Abée

2013

Dekan: Prof. Dr. Dr. Torsten E. Reichert

1. Berichterstatter: PD Dr. Andreas Gaumann

2. Berichterstatter: Prof. Dr. Edward K. Geissler

Tag der mündlichen Prüfung: 07.02.2014

1	Einleitung.....	1
1.1	Das Urothelkarzinom der Harnblase	1
1.1.1	Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese	1
1.1.2	Morphologie, Histopathologie und Genetik.....	2
1.1.3	Klassifikationen.....	6
1.2	FGFR-3 Mutationen bei Harnblasentumoren.....	9
1.3	Grundlagen der Angiogenese.....	11
1.3.1	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor (FGFR)	12
1.3.2	Fibroblast-Growth-Factor (FGF).....	13
1.4	Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation.....	15
2	Material und Methoden.....	16
2.1	Material.....	16
2.1.1	Gewebeproben und klinisch-pathologische Daten	16
2.1.2	Grundmaterialien.....	18
2.1.3	Reagenzien und Lösungen.....	20
2.1.3.1	Allgemeine Lösungen.....	20
2.1.3.2	Lösungen für die HE-Färbung von Paraffinschnitten.....	20
2.1.3.3	Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial.....	20
2.1.3.4	Material für die immunhistochemischen Färbungen	21
2.1.3.4.1	Puffer und Substratlösungen	21
2.1.3.5	Antikörper und Antikörperkomplexe	22
2.1.3.5.1	von Willebrand Faktor/Faktor VIII.....	22
2.1.3.5.2	CD 31 (PECAM, Platelet endothelial cell adhesion molecule)	23
2.1.3.5.3	ICAM-1 (CD54)	23
2.1.3.5.4	FGFR1, FGFR3, FGFR4, FGF-1, FGF-2	24
2.1.4	Material für die FGFR3-Mutationsanalyse	24
2.1.5	Fotodokumentation.....	26
2.1.6	Datendokumentation und Auswertung am Computer	26
2.2	Methoden	27
2.2.1	Herstellung von Paraffinschnitten	27
2.2.2	Entparaffinieren der Gewebeschnitte	27
2.2.3	HE-Färbung	27
2.2.4	FGFR3-Mutationsanalyse	28

2.2.4.1	Mikrodissektion der Tumorareale, Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung	28
2.2.4.2	Amplifikation von DNA mittels PCR.....	29
2.2.4.3	Protokoll	30
2.2.4.4	Beispielsergebnisse Mutationsanalyse	32
2.2.5	TMA (Tissue-Micro-Array)-Herstellung	32
2.2.6	Immunhistochemie	41
2.2.6.1	Färbemethoden	41
2.2.6.2	Protokoll CD 31(DAKO®).....	42
2.2.6.3	Protokoll vWF/Faktor VIII (DAKO®).....	42
2.2.6.4	Protokolle FGFRs und FGFs	43
2.2.7	Morphometrie des Gefäßsystems	45
2.2.8	Datendokumentation und Auswertung am Computer	47
2.2.8.1	Fotodokumentation	47
2.2.8.2	Auswertung und Dokumentation der Daten	47
2.2.8.3	Statistische Analysen	47
3	Ergebnisse	49
3.1	Patientenkollektiv.....	49
3.2	FGFR3-Mutationsstatus und klinische/klassische histopathologische Daten	50
3.3	Tumorangiogenese	56
3.3.1	Ergebnistabelle	56
3.3.2	Korrelationsanalyse MVC, VSA Werte der Gefäßmarker Faktor VIII und CD 31	58
3.3.3	Korrelationsanalyse der Gefäßmarker Faktor VIII und CD 31 mit klassischen histopathologischen Parametern.....	59
3.3.4	Tumorangiogenese und Überlebensfunktionen.....	61
3.4	Proteinexpression	65
3.4.1	Ergebnisse	65
3.4.2	Korrelation Proteinexpression und Überlebenskurven.....	67
3.4.3	Korrelationsanalyse der Gefäßmarker Faktor VIII/CD 31 mit der Proteinexpression der Tumorzellen.....	72
4	Diskussion	73
4.1	Kritische Betrachtung von Material, Methoden und Auswertung.....	73
4.2	FGFR3-Mutationsstatus, klinische/klassische histopathologische Daten, Angiogenese ..	75
4.3	FGFR3-Mutation, Proteinexpression und klinische Parameter	77

4.4 Tumorangiogenese, klassische histopathologische/klinische Parameter und Proteinexpression.....	82
5 Zusammenfassung und Ausblick.....	86
5.1 Zusammenfassung.....	86
5.2 Ausblick.....	88
6 Literaturverzeichnis	90
7 Anhang.....	97
7.1 Abkürzungsverzeichnis	97
7.2 Danksagung	100
7.3 Lebenslauf.....	101
7.4 Erklärung.....	102

1 Einleitung

1.1 Das Urothelkarzinom der Harnblase

1.1.1 Epidemiologie, Ätiologie und Pathogenese

Das Harnblasenkarzinom ist nach dem Prostatakarzinom der zweithäufigste urologische Tumor und macht derzeit etwa zwei bis drei Prozent aller malignen Tumoren aus. Männer sind im Vergleich zu Frauen etwa drei bis viermal so häufig betroffen. Es handelt sich um die vierthäufigste Tumorerkrankung beim Mann und die zehnthäufigste Tumorerkrankung der Frau. Pro Jahr erkranken in Deutschland nach Informationen des Robert-Koch-Instituts von 2008 circa 16000 Menschen an einem invasiven Harnblasenkarzinom, dazu kommen mehr als 12000 Patienten mit in situ-Tumoren bzw. Tumoren unsicheren biologischen Verhaltens. Über 5000 Patienten versterben jährlich tumorbedingt (Bertz et al. 2012).

Die Erkrankungsrate des Harnblasenkarzinoms steigt mit dem Lebensalter an. Das mittlere Erkrankungsalter liegt für Männer bei 73 und für Frauen bei 77 Jahren (Bertz et al. 2012). Nur etwa jeder Fünfte erkrankt vor dem 65 Lebensjahr.

Die vorliegende Dissertation bezieht sich auf Harnblasenkarzinome urothelialen Ursprungs (sogenannte Urothelkarzinome), welche mehr als 95% der Harnblasenkarzinome ausmachen. Sie entstehen in der Schleimhaut (Urothel), die neben der Harnblase auch Nierenbecken, Harnleiter und Harnröhre auskleidet und lassen sich häufig multifokal nachweisen. Sehr viel seltener sind Plattenepithelkarzinome, Adenokarzinome oder anaplastische Karzinome (Müller, 2003). Bei 70-80% der betroffenen Patienten liegt bei Diagnosestellung ein oberflächlicher Tumor vor (pTa, pT1), während bei 30% bereits ein fortgeschrittenes Tumorstadium nachgewiesen wird (pT2, pT3). Unterschieden werden flache von papillären Wachstumsformen (Eble et al. 2004).

Das Harnblasenkarzinom entsteht auf dem Boden eines multifaktoriellen, mehrstufigen Prozesses (Bichler et al. 2000). Neben Alter und Geschlecht sind für die Karzinogenese der Harnblase vor allem berufliche und außerberufliche Umwelteinflüsse sowie bestimmte Lebensgewohnheiten von Bedeutung. Ungefähr 25% der Erkrankungen sind auf Umweltfaktoren zurückzuführen, wobei zwischen der Einwirkung der Kanzerogene und der Tumorentstehung 10 bis 40 Jahre vergehen können. Als Hauptursache gilt der Tabakkonsum.

In einer Kohortenstudie lag das relative Risiko an einem Blasenkarzinom zu erkranken im Vergleich zu Nichtrauchern bei etwa 2,7 (Alberg, 2007).

Den wichtigsten beruflichen Risikofaktor stellt die Exposition gegenüber aromatischen Aminen dar, die vor allem in der Färbemittelindustrie, Gummiindustrie, bei Malern und in der Lederindustrie Verwendung finden. Die Karzinomerkrankung wird bei Exposition mit aromatischen Aminen in entsprechenden Betrieben als Berufskrankheit nach Nr. 1301 der Berufskrankheitenverordnung anerkannt (Norpoth et Woitowitz, 1994).

Eine weitere Rolle spielen eine chronische Zystitis, Medikamente und Radiotherapie im kleinen Becken. Als erwiesen gilt zudem die Assoziation zwischen der Schistosomiasis (Bilharziose) und der Harnblasentumorgenese (Bichler et al. 2000).

1.1.2 Morphologie, Histopathologie und Genetik

Primäre Harnblasentumore zeigen sich histologisch als Urothel-, Plattenepithel-, Adeno- und anaplastische Karzinome. Sie entstehen bevorzugt an Stellen, an denen kanzerogene Noxen persistieren, wobei die Seitenwände zu 46%, die Hinterwand zu 18%, das Trigonum zu 13%, das Blasendach zu 9%, die Vorderwand zu 8% und der Blasen Hals zu 6% betroffen sind (Helpap, 1993). Sekundäre Blasentumoren entstehen durch Infiltration (weibliches Genitale, Prostata, Kolon) und Metastasierung (Mamma-, Magen-, Bronchialkarzinom, Melanom) und sind mit weniger als 1% äußerst selten. Andere selten vorkommende mesenchymale Tumoren sind entweder benigner (Fibrom, Myxom, Leiomyom, Hämangion, Neurofibrom, Neurinom, Phäochromozytom) oder maligner Natur (Leiomyosarkom, Fibrosarkom, Rhabdomyosarkom, retikuloendotheliale Tumore) (Mostofi, 2000) (Helpap, 2002). Zusätzlich finden sich Infiltrationen von Lymphomen (z.B. Plasmazytom).

Das normale Harnblasenepithel (Urothel) besitzt drei bis sieben Zellschichten. Der Basalmembran sitzen kleine kubische Basalzellen auf, von denen proliferierte und differenzierte Zellen zum Lumen der Harnblase hinwandern und dort als Umbrellazellen schirmartig dem Urothel aufliegen (Bichler et al. 2000) (Helpap et Köllermann, 2000).

Eine Hyperplasie des Urothels entsteht durch Proliferation (Hildebrandt 1998). Sie kann fokale oder diffus zu einer Verbreiterung des Urothels führen und teilweise zelluläre Atypien beinhalten. Beim Auftreten von papillären Hyperplasien ist eine Abgrenzung zu den sogenannten benignen Papillomen bzw. gut differenzierten Karzinomen schwierig (Bichler et

al. 2000). Die reaktive Atypie umfasst Veränderungen des Gewebes aufgrund von chronisch entzündlichen Prozessen, Infektionen, Steinleiden oder medikamentös-toxischer Induktion (Helpap et Köllermann, 2000).

Die Abnahme der Palisadenstellung der Basalzellen und zunehmende Atypien führen zur Urotheldysplasie (Hildebrandt, 1998). Die Übergänge von Dysplasie zum Carcinoma in situ (CIS) sind fließend und teilweise schwer differenzierbar (Kunze, 1998).

Das CIS ist gekennzeichnet durch eine hochgradige Kernpolymorphie und Desquamation einzelner Zellen und gilt als karzinomatöse Vorstufe. Es besitzt grundsätzlich ein hohes Malignitätspotential mit einer schnellen Progression hin zu einem soliden invasiven Tumor und zeigt ein flaches nicht infiltratives, oberflächliches, nicht-papilläres Wachstumsmuster. Hauptmerkmale des CIS sind stark vergrößerte hyperchromatische Zellkerne mit prominenten Nukleoli sowie eine erhöhte mitotische Aktivität. Zudem findet sich suburothelial eine ausgeprägte Neoangiogenese (Riede et Schäfer, 1995) (McKenney et al. 2001). Das CIS tritt sowohl als solitäre Tumorentität, häufig aber auch synchron mit anderen Tumoren in der Harnblase auf (Jakse et al. 1989) (Althausen et al. 1976).

Hinsichtlich Tumorbilogie und Progressionsrate können zwei unterschiedliche Formen des Urothelkarzinoms unterschieden werden. Die papilläre Form (Ta, T1) mit zumeist hohem bis mässigen Differenzierungsgrad (G1 – G2) stellt mit 75-85% die bei Erstdiagnose am häufigsten gefundene Entität dar. Histologisch zeigt sich das exophytische Wachstumsmuster durch ein fibrovaskuläres Stroma, welches von Urothelzellen bedeckt ist. Diese papillären Tumoren besitzen ein geringes malignes Potential bei einem allerdings hohen Rezidivrisiko und können multifokal auftreten. 10-15% dieser Tumoren gehen im weiteren Krankheitsverlauf in ein muskelinvasives Urothelkarzinom über (Grignon, 1997).

Demgegenüber steht eine bei Erstdiagnose bereits muskelinvasive Form von Urothelkarzinomen (ungefähr 30%) mit einem T2- oder höheren Tumorstadium und deutlich schlechterer Prognose. Das solide, nicht-papilläre invasive Urothelkarzinom besitzt dabei vergrößerte, pleomorphe und hyperchromatische Zellkerne mit teils bizarrer Morphologie, wobei die sehr hohe Mitoserate das hohe Malignitätspotential unterstreicht (Grignon, 1997).

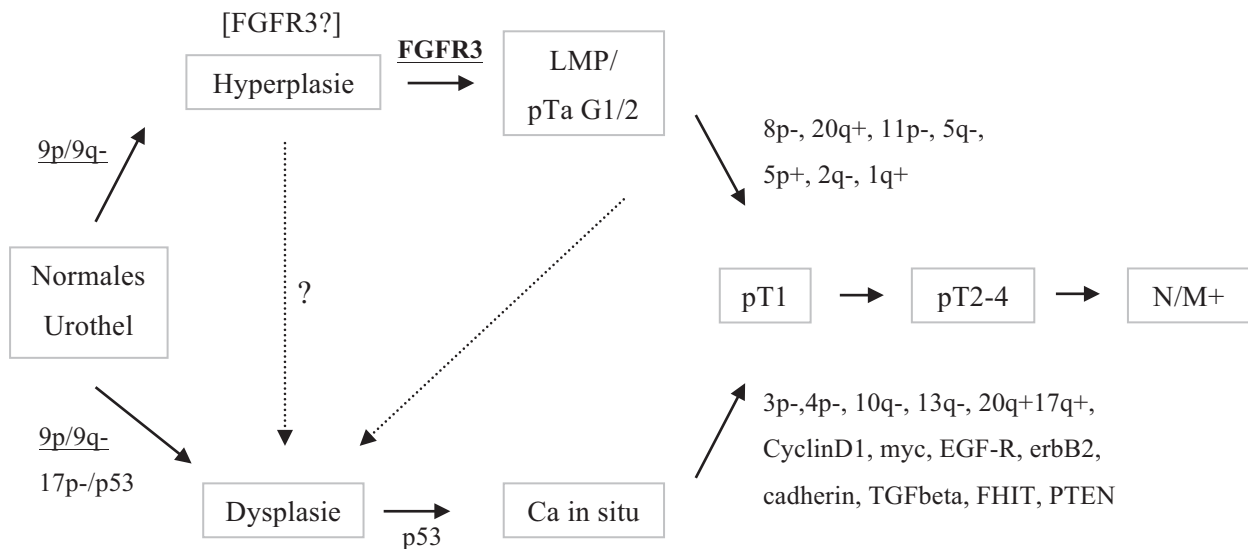


Abb. 1: Molekulare Veränderungen in der Mehrstufenkarzinogenese des Harnblasenkarzinoms (modifiziert nach Stöhr et al. 2004)

Als Herausforderung beim Urothelkarzinom gilt die Frage welcher Patient mit nicht invasivem Karzinom im weiteren Krankheitsverlauf in ein invasives Karzinom progressiert. Aufgrund der verschiedensten morphologischen und histopathologischen Erscheinungsformen scheint es möglich, dass dabei viele verschiedene molekulare und genetische Alterationen eine Rolle spielen. Die Mehrstufenkarzinogenese in Abb.1 zeigt dabei zwei Subgruppen mit eindeutig unterschiedlichem Verlauf. Aufgrund ihrer genetischen Stabilität können Urothelkarzinome daher in zwei Subtypen unterschieden werden. Zum Einen die niedrigmalignen nicht invasiven papillären Tumoren pTa G1-2 (PUNLMP) bei denen nur wenige genetische Aberrationen nachgewiesen wurden. Bei diesen Entitäten finden sich zumeist FGFR3 Mutationen und Verluste des Chromosoms 9. Demgegenüber stehen genetisch instabilere Formen, die die hochgradigen (pTa G3) und invasiven Karzinome (pT1-4) umfassen. Bei diesen finden sich häufig hohe Amplifikationsraten, p53 Mutationen und DNS-Aneuploidie (Sauter et al. 2004).

Gene mit entsprechendem Potential für eine molekulare Klassifikation beinhalten Onkogene, Tumorsuppressorgene, Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie Gene, die den Zellzyklus beeinflussen. In der Literatur wurden spezifische Moleküle mit verändertem Expressionsmuster in Urothelkarzinomen beschrieben, wozu unter anderem Her2/neu, EGFR,

H-ras, MDM2, p53, p63, Ki-67, FGFR3, CD44, Cytokeratin 20, PTEN, RB1, Cyclin D1, p15, p16, p21 oder p27 gehören (Parker et al. 2003) (Sauter et al. 2004).

1.1.3 Klassifikationen

Die TNM-Klassifikation beschreibt die Ausbreitung des Primärtumors, die bereits erfolgte Metastasierung in regionäre Lymphknoten und das Vorhandensein von Fernmetastasen. Wird die Tumorausbreitung (Staging) der Harnblasentumore anhand von Operationspräparaten und histologischer Begutachtung bestimmt, wird dies in der Klassifikation durch das Präfix p (p für pathologisch) gekennzeichnet.

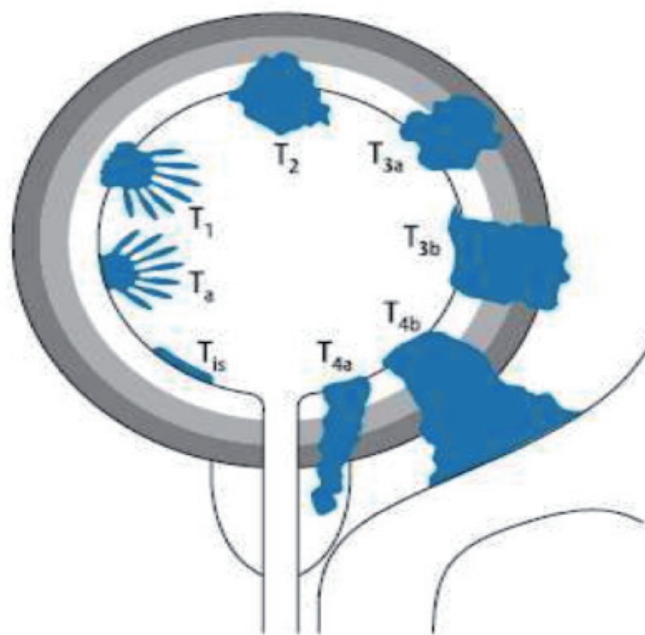


Abb. 2: Tumorstadien des Harnblasenkarzinoms: Ta, Tis, T1-T4 zeigen die unterschiedlichen Infiltrationstiefen (aus Gasser et Rutishauser, 2006).

Im Stadium Ta ist der Tumor noch auf die Blasenmukosa beschränkt. Im Stadium T1 infiltriert der Tumor das subepitheliale Bindegewebe bis zur Lamina propria. Durchbricht der Tumor die Lamina propria und wächst bis in die oberflächliche Muskelschicht liegt ein T2-Stadium vor. Wird zusätzlich das perivesikale Gewebe infiltriert, wird der Tumor ins Stadium T3 eingeteilt. Bei Infiltration der Nachbarorgane des kleinen Beckens (Prostata, Samenblase, Uterus, Vagina) ist das Stadium T4 erreicht. Mit dem Zusatz (m) werden multiple Läsionen bezeichnet.

T – Primärtumor (Lokale Ausdehnung)

TX	Primärtumor kann nicht beurteilt werden
T0	Kein Nachweis des Primärtumors
Ta	Nicht-invasiver papillärer Tumor
T1	Tumor infiltriert das subepitheliale Bindegewebe
T2	Tumor infiltriert die Muskulatur:
T2a	Tumor infiltriert die oberflächliche Muskulatur (innere Hälfte)
T2b	Tumor infiltriert die tiefe Muskulatur (äussere Hälfte)
T3	Tumor infiltriert das perivesikuläre Gewebe:
T3a	mikroskopisch
T3b	makroskopisch
T4	Tumor infiltriert in eine der folgenden Strukturen: Prostata, Uterus, Vagina, Beckenwand, Bauchwand
T4a	Tumor infiltriert Prostata, Uterus oder Vagina
T4b	Tumor infiltriert die Becken- oder die Bauchwand

N – Lymphknoten

NX	Regionale Lymphknoten können nicht beurteilt werden
NO	Keine regionalen Lymphknoten-Metastasen
N1	Metastase in einem solitären Lymphknoten ≤ 2cm in grösster Ausdehnung
N2	Metastasen in solitärem Lymphknoten > 2cm aber < 5cm in grösster Ausdehnung
N3	Metastasen in Lymphknoten > 5cm in grösster Ausdehnung

Bei der lymphogenen Metastasierung werden in der Regel zunächst die Lymphknoten des kleinen Beckens in der Fossa obturatoria und der iliakalen Region befallen.

M – Fernmetastasen

MX	Fernmetastasen können nicht beurteilt werden
M0	Keine Fernmetastasen
M1	Fernmetastasen

Die hämatogene Metastasierung erfolgt beim Harnblasenkarzinom vor allem in die Lunge, das Skelettsystem und die Leber (Tanagho et McAninch, 1992).

Das Grading (Differenzierungsgrad) der Harnblasentumore beurteilt die Stärke der Zellmorphologieabweichungen und korreliert mit dem Tumorstadium und der Überlebenszeit des Patienten. Das alte Tumorgrading der Weltgesundheitsorganisation (WHO) von 1973 wurde von dieser und der Internationalen Gesellschaft für Urothologie (ISUP, International Society of Urological Pathology 1998 überarbeitet und im Jahr 2004 erneuert. Es stellt sich wie folgt dar:

WHO – Grading 1973

Urothelpapillom
Grad 1: gut differenziertes Karzinom
Grad 2: mässig differenziertes Karzinom
Grad 3: schlecht differenziertes Karzinom

WHO – Grading 2004

Urothelpapillom
Papilläres urotheliales Neoplasma mit niedrig malignem Potential (PUNLMP)
Papilläres Urothelkarzinom mit niedrigem Malignitätsgrad (low-grade)
Papilläres Urothelkarzinom mit hohem Malignitätsgrad (high-grade)

Die Klassifikation von 1973 unterschied das Papillom vom Urothelkarzinom Grad 1-3. Grad-1-Tumoren zeigen dabei den geringsten Anaplasiegrad, Grad-3-Tumoren den höchsten, wobei die Einteilung in Grad 1-3 nicht eindeutig definiert ist. Daher ist die grosse Gruppe der Grad-2-Tumoren unzureichend charakterisiert. Zusätzlich wurden in der alten Klassifikation alle papillären Tumore einem Karzinom gleichgesetzt. Um den Erfahrungen in Bezug auf Progression und Mortalität der Low-Grade-Urothelkarzinome gerecht zu werden, wurde in der Aktualisierung des WHO-Grading die Kategorie PUNLMP eingeführt. Kennzeichnend für die WHO-Klassifikation von 2004 ist die Unterscheidung von papillären urothelialen Neoplasien von niedrigem malignen Potential (PUNLMP, entsprechend pTa G1-2) und andererseits low-grade sowie high-grade Karzinome. Die intermediäre Gruppe (G2) wurde gestrichen. Durch diese Einteilung sollten einheitliche Diagnoseergebnisse gewährleistet und Risikoprofile besser erarbeitet werden.

In den Guidelines der European Association of Urology vom März 2008 wird empfohlen beide Klassifikationen noch nebeneinander zu verwenden, bis die neue WHO – Klassifikation von 2004 validiert ist.

Da die Daten für diese Dissertation aus den Jahren vor 2004 stammen und auch die Mehrzahl der bisher veröffentlichten Studien die WHO – Klassifikation von 1973 anwendet, wird letztgenannte für die hier vorliegende Dissertation angewandt.

1.2 FGFR-3 Mutationen bei Harnblasentumoren

Rezeptoren für Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFRs) gehören zur Tyrosin-Kinase-Rezeptor-Familie. Sie bestehen aus einer extrazellulären Domäne mit zwei oder drei „immunoglobulin-like“ Domänen, einer Transmembrandomäne und einer zytoplasmatischen Tyrosin-Kinase-Domäne. Sie binden Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) und übertragen das entsprechende Signal ins Zellinnere.

Das FGFR3-Gen ist auf dem Chromosom 4p16.3 lokalisiert. Es besitzt 19 Exons, die eine genomische Sequenz von 16,5 kb einnehmen. Liegt eine FGFR3 Mutation vor kommt es zu einer ligandenunabhängigen überschiessenden nicht mehr reversiblen Rezeptoraktivierung. Dies führt beispielsweise bei Patienten mit Achondroplasie und thanatophorem Zwergwuchs zu einem verfrühten Schluss der Wachstumsfugen und damit zu einem verminderten Längenwachstum der Röhrenknochen bis hin zu letalen Skelettveränderungen (Rousseau et al. 1995). In Harnblasentumoren wurden diese spezifischen FGFR3-Mutationen erstmals von Cappellen et al. (1999) in einem hohen Prozentsatz (35%) beschrieben. Folgende Mutationen wurden ermittelt:

Exon 7	Codon 248: CGC \Rightarrow TGC, Codon 249: TCC \Rightarrow TGC
Exon 10	Codon 372: GGC \Rightarrow TGC
Exon 15	Codon 652: AAG \Rightarrow GAG

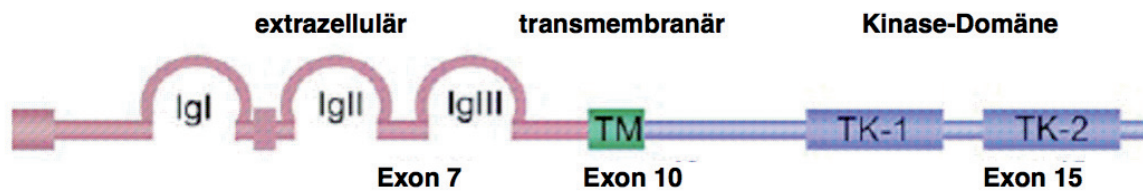


Abb.3: Positionen der FGFR3-Mutationen bei Harnblasenkarzinomen (nach Knowles, 2007),
 Legende: IgI, IgII, IgIII: Immunglobulin ähnliche Domänen; TK-1, TK-2: geteilte Tyrosinkinase-Domänen

Bei den FGFR3-Mutationen handelt es sich um somatische Mutationen (Spontanmutationen), Keimbahnmutationen wurden bisher nicht nachgewiesen. Studien zeigten, dass FGFR-3 Mutationen sehr spezifisch und ausschliesslich in Urotheltumoren zu finden und nur zu einem sehr geringen Teil in anderen Tumorentitäten nachzuweisen sind (Karoui et al. 2001) (Sibley et al. 2001b). Weitere Studien zeigten eine Korrelation von FGFR3-Mutationen mit einem verminderten Rezidivrisiko von Harnblasenkarzinomen (van Rhijn et al. 2001) sowie einen signifikant hohen Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationen und dem oberflächlichen pTa-Stadium von Urotheltumoren, jedoch keinen Zusammenhang mit fortgeschritten invasiven Tumoren (pT1-4) oder flachen Neoplasien (Billerey et al. 2001). Statistisch gesehen ist FGFR3 das am häufigsten mutierte bekannte Onkogen beim nicht-invasiven pTa-Tumor der Harnblase und scheint damit ein potentiell, initiales Schlüsselereignis in der Entwicklung von Harnblasenkarzinomen darzustellen, welches mit einer guten Prognose für den Patienten verbunden ist. 2002 beschrieb Stöhr FGFR3 als viel versprechendes Target für die Routine-Nachsorge von Patienten mit bekannter FGFR3 Mutation im Primärtumor (Stöhr, 2002).

1.3 Grundlagen der Angiogenese

Der Begriff „Angiogenese“ bezeichnet das Aussprossen von Kapillaren aus vorbestehenden Blutgefäßen. Gefäßwand bildende Endothelzellen stehen dabei unter enger Kontrolle von endogenen Angiogenesestimulatoren wie beispielsweise Fibroblast growth factors (FGFs) oder Vascular endothelial growth factors (VEGF-A, B, C, D) und endogenen Angiogeneseinhibitoren wie Thrombospondin 1 und 2 oder Angiostatin (Pepper, 1997). Unter physiologischen Bedingungen befinden sich diese Faktoren in einem Gleichgewicht (Denekamp, 1993). Die oben beschriebene Gefässneubildung ist essentiell für bestimmte physiologische Abläufe, doch auch Wachstum und Progression maligner Tumoren ist angiogeneseabhängig (Folkman, 1989). Durch Entartung einer Körperzelle bildet sich ein maligner Zellklon, der zunächst angiogeneseunabhängig wächst und keine eigenen Blutgefäße ausbildet (Rak et al. 1995). Er befindet sich somit zunächst in einer avaskulären Phase (angiogenes Gleichgewicht) wobei die Tumorzellen über Diffusion mit Sauerstoff und Nährstoffen versorgt werden. Überschreitet der Tumor eine bestimmte Grösse, reicht die Diffusionsstrecke zur Aufrechterhaltung der Tumorversorgung nicht mehr aus. Ein weiteres Wachstum ist dann nur durch Aktivierung der Angiogenese möglich. Bei malignen Zellklonen, die zu klinisch relevanten Tumorerkrankungen heranwachsen, verschiebt sich an dieser Stelle das angiogene Gleichgewicht zugunsten der Angiogenese (Hanahan et Folkman, 1996). Dabei kommt es entweder zu einer gesteigerten Sekretion oder Freisetzung von Angiogenesestimulatoren oder zu einer Hemmung der Sekretion oder Freisetzung von Angiogeneseinhibitoren.

Die konsekutive Aktivierung von Endothelzellen führt zur Dilatation und Permeabilitätssteigerung der Kapillaren. Bindegewebsfibroblasten setzen Proteasen frei, welche die Auflösung der extrazellulären Matrix und vaskulären Basalmembran bewirken. Endothelzellen können nun in Richtung des angiogenen Stimulus wandern. Unter dem Einfluss der Angiogenesefaktoren beginnen die Endothelzellen zu proliferieren und bilden gefässähnliche Strukturen. Die Steuerung der Angiogenese erfolgt durch viele Regulationsmoleküle.

Positive Regulatoren	Negative Regulatoren
Angiogenin	Angiostatin
EGF / TGF- α	C-X-X Chemokine: PF 4; IP-10; gro- β
FGF-1, -2, -3	Hyaluronidase
G-CSF	IL-12
Hypoxie	Interferone
IL-8	MMP und PA Inhibitoren
PDGF-BB	16 kd prolactin fragment
PIGF	Retinoide
Proliferin	Ribonuklease Inhibitoren
Prostaglandine	TGF- β
Thymidine Phosphorylase/ PD-ECGF	TNF- α
Tissue factor	
VEGFs/ VPF	

(nach Pepper, 1997)

Durch die Bildung neuer Kapillaren wird die Versorgung eines Tumors mit Nährstoffen und Sauerstoff sichergestellt (Folkman, 1992). Zudem haben Endothelzellen einen parakrinen, stimulierenden Effekt auf die Tumorzellproliferation. In der sogenannten „vaskulären Phase“ des Tumorwachstums proliferieren die Tumorzellen exponentiell (Rak et al. 1995). In dieser Phase können auch typische Tumorsymptome wie beispielsweise die Hämaturie beim Harnblasenkarzinom auftreten. Verglichen mit dem Normalgewebe kommt es durch die lokale Stimulation des Gefäßwachstums zu einer erhöhten Dichte von Blutgefäßen im Tumor. Die Ausprägung dieser Gefäßdichte (Vascularity Density) konnte in unterschiedlichen Tumorentitäten mit der Prognose der Erkrankung korreliert werden. Zusätzlich wurde eine gute Korrelation von erhöhten Werten für Angiogenesestimulatoren wie FGF und VEGF bei Tumoren und der Prognose der Erkrankung dargestellt (siehe Kapitel 4).

1.3.1 Fibroblast-Growth-Factor-Receptor (FGFR)

Es existieren insgesamt vier Rezeptoren für Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFRs). 1989 wurde der erste im Detail charakterisierte FGF-Rezeptor (FGFR1) aus Hühnerembryonen isoliert (Lee 1989). Kurz darauf folgte die Identifizierung der Gene für drei weitere FGFRs, die in der Reihenfolge ihrer Entdeckung als FGFR2 (Dionne et al. 1990), FGFR3 (Keegan et al. 1991) und FGFR4 (Partanen et al. 1991) bezeichnet wurden. Die von diesen vier Genen

codierten Proteine sind einander strukturell sehr ähnlich und in ihrer Aminosäuresequenz hoch konserviert. FGFRs bestehen aus einer extrazellulären Region mit drei immunglobulin-ähnlichen (IG-like) Domänen (D1-D3), einer singulären transmembranösen Helix und einer intrazellulären Domäne mit Tyrosin-Kinase Aktivität (Lee 1989). Durch alternatives mRNA-Spleissen von FGFR1-3 entstehen zusätzliche Formen, von denen insgesamt sieben bekannt sind. Diese werden mit „b“ und „c“ bezeichnet (Ornitz 1996). Der nach Bindung von FGF und FGFR entstehende Signalkomplex an der Zellmembran („ternary complex“) besteht aus zwei identischen FGF-Liganden, zwei identischen FGF-Rezeptoreinheiten und entweder einer oder zwei Heparansulfatketten (Ornitz et Itoh, 2001). Die Signaltransduktion erfolgt dabei durch Bindung des Ligandenmoleküls an den Rezeptor, was zur Dimerisierung von zwei Rezeptormonomeren führt und somit eine Aktivierung des Rezeptors bewirkt (Heldin et Miyazono, 1995). Die Dimerisierung der FGFRs kann zwischen Rezeptoren des gleichen oder zwischen Rezeptoren verschiedener Subtypen erfolgen (Bellot et al. 1991). Die FGF-Bindung und Dimerisierung wird über Heparansulfat-Proteoglykane (HSPGs) vermittelt und potenziert (Kann et al. 1993). Sie induziert Konformationsänderungen in den zytoplasmatischen Bereichen der Rezeptormonomere. Dadurch werden die Kinase-Domänen aktiviert (Keating et al. 1988) und die beiden Monomere phosphorylieren sich gegenseitig an spezifischen Tyrosin-Resten (Heldin et Miyazono, 1995) und interagieren über diese schließlich mit zahlreichen zytoplasmatischen Proteinen.

1.3.2 Fibroblast-Growth-Factor (FGF)

Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) gehören in die Gruppe der Peptid-Wachstumsfaktoren und bilden eine Familie von Polypeptid-Mitogenen mit einer Masse zwischen 16 und 22 kDa. In den 70er Jahren wurden die ersten FGFs entdeckt und ihre chemischen Strukturen beschrieben. Ihre Bezeichnung entstand durch die ersten charakterisierten FGFs (FGF-1 und FGF-2), die aufgrund ihrer mitogenen Wirkung auf Fibroblasten gereinigt worden waren (z.B. Armelin 1973). Man nahm an, dass sie ausschliesslich auf Fibroblasten wirken, fand jedoch später heraus, dass sie auf fast alle Zellen wirken können. Mittlerweile sind 23 verschiedene FGFs bekannt, von denen einige wie FGF-7 und FGF-9 keinerlei Wirkung auf Fibroblasten, sondern auf Epithel- und Gliazellen zeigen. FGFs gehören zu Signalproteinen, die an der Regulation des Zellwachstums und der Differenzierung von Zellen beteiligt sind. Sie stimulieren die Proliferation, Migration und Differenzierung von

Zellen, insbesondere von Endothelzellen, aber auch von Muskelzellen (vor allem glatte Muskelzellen) und Fibroblasten. Zudem spielen sie eine Schlüsselrolle bei der embryonalen Entwicklung und führen bei entsprechenden Veränderungen zu schweren Entwicklungsstörungen. Im adulten Organismus steuern FGFs gewebereparative Prozesse und regulieren die Wundheilung und die Regeneration von Nerven- und Knorpelgewebe. Zudem wird der komplexe Prozess der Angiogenese wesentlich von ihnen gesteuert. FGFs werden physiologisch bei jeder Form der Gewebeschädigung, insbesondere bei Hypoxie und Ischämie aktiv sezerniert. Die beiden wichtigsten Vertreter sind FGF-1 und FGF-2. FGF-1 stellt den aktivsten Wachstumsfaktor der FGF-Familie dar und besteht aus 141 Aminosäuren (Blaber et al. 1996). Das FGF-1 codierende Gen ist auf Chromosom 5 lokalisiert. Durch seine besondere Bindungskapazität ist FGF-1 der einzige Ligand, der an alle sieben Rezeptoren der Zelloberfläche bindet. Dadurch sind seine mitogenen Zelleffekte besonders ausgeprägt. FGF-2 besitzt eine ähnliche molare Masse wie FGF-1 und stimmt strukturell zu mehr als 50% mit FGF-1 überein. Das FGF-2 codierende Gen ist auf dem Chromosom 4 lokalisiert. Die Wirkung von FGF-2 entspricht der von FGF-1, ist jedoch nicht so intensiv ausgeprägt. Das mitogene Potential von FGF-1 und FGF-2 erstreckt sich auf eine grosse Anzahl verschiedener Zelltypen und spielt eine wichtige Rolle beim Wachstum als auch bei der Steuerung der Motilität von Endothelzellen (Burgess et Maciag, 1989) (Folkman et Klagsbrun, 1987). In verschiedenen Tumorentitäten wie dem Nieren-, Mamma- und Urothelkarzinom konnte bis dato häufig eine erhöhte Expression von FGFs nachgewiesen werden (Folkman, 1996).

1.4 Fragestellung und Zielsetzung der Dissertation

Das Management und die Prognoseabschätzung von Urothelkarzinomen bezüglich Rezidivrate und Gesamtüberleben betroffener Patienten gestaltet sich schwierig. So wird intensiv nach neuen Zusammenhängen zwischen molekularen Markern, Tumorprogression, Rezidivraten und möglichen Therapieansätzen gesucht. Der Tumorangiogenese wurde dabei in zahlreichen Tumorentitäten wie auch im Urothelkarzinom eine grosse Bedeutung im Hinblick auf Tumorprogression und Gesamtüberleben zugesprochen.

Ziel der vorliegenden Arbeit soll es sein, einen Beitrag zur Frage zu leisten ob und welchen Einfluss die Expression spezifischer Angiogenesemodulatoren, wie Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) und ihre Rezeptoren oder Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 durch die Tumorzellen auf das Gesamt- und Rezidivfreie Überleben der Patienten haben. Zudem wird der direkte Einfluss dieser Faktoren auf die Tumorangiogenese untersucht. Als weiteres wichtiges Untersuchungsziel wird ein möglicher Unterschied in der Expression der Angiogenesefaktoren und somit der Gefässquantität bei Tumoren mit nachgewiesener FGFR3 Mutation angesehen. Ziel soll es sein mögliche Zusammenhänge zwischen FGFR3-Mutation, Tumorangiogenese, Proteinexpression verschiedener Angiogenesemodulatoren und Follow-up Daten der Patienten aufzudecken.

Von 61 Urothelkarzinomen verschiedenster Tumorstadien und- differenzierungsgrade wurde daher mithilfe der SnapShot-Sequenzierung eine FGFR3-Mutationsanalyse durchgeführt, wobei als Substrat zur Gewinnung der DNA der Tumorzellen formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebe verwendet wurde, aus dem nach manueller Mikrodissektion die Tumor-DNA isoliert werden konnte. Das Patientenkollektiv wurde anschliessend in Mutanten und Wildtypen unterteilt. Zusätzlich wurde die Tumorangiogenese quantitativ immunhistochemisch mithilfe der beiden Gefässmarker CD31 und Faktor VIII bestimmt sowie eine vorhandene oder fehlende Proteinexpression der Marker FGF-1, FGF-2, FGFR1, FGFR3, FGFR4 und ICAM-1 immunhistochemisch mithilfe der TMA-Technik ermittelt. Die Ergebnisse wurden anschliessend mithilfe des Statistikprogramm SPSS ausgewertet und untereinander und mit klinischen Parametern in Bezug gesetzt. Dabei wurde nach möglichen Zusammenhängen zwischen FGFR3-Mutation, Tumorangiogenese, Proteinexpression und Prognose der Patienten gesucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Proteinexpression auf die Tumorangiogenese untersucht.

2 Material und Methoden

2.1 Material

2.1.1 Gewebeproben und klinisch-pathologische Daten

In der folgenden Arbeit wurden die Daten von 61 Patienten mit Harnblasenkarzinom eingeschlossen, deren Gewebeproben am Institut für Pathologie am Klinikum der Universität Regensburg histologisch begutachtet wurden. Die Datenerhebung sowie der Ermittlung der Follow-up-Informationen erfolgte anhand des PAS-Systems des pathologischen Instituts am Klinikum der Universität Regensburg und des Tumorzentrums Regensburg. Im PAS-System werden alle histologischen Gutachten seit 1989 per elektronischer Datenverarbeitung (EDV) archiviert. Bei den ausgewählten Patienten wurde zwischen den Jahren 1996 und 2006 Tumorgewebe durch transurethrale Resektion gewonnen und ein Urothelkarzinom diagnostiziert. Die Nutzung des Archivmaterials der Patienten wurde gemäß den Richtlinien der Ethikkommission durchgeführt.

Ausreichendes Tumormaterial konnte von 13 weiblichen und 48 männlichen Patienten analysiert werden, wobei sich ein Altersspanne von 41 bis 94 Jahren ergab (Median 67,5 Jahre). Das Follow-up der Patienten bewegte sich zwischen 16 und 132 Monaten mit einem Median von 74 Monaten. 20 Patienten entwickelten im Verlauf ein lokales Rezidiv. Zudem starben im Verlauf 7 Patienten aufgrund dieser Tumorerkrankung und 21 ohne Bezug dazu.

Sämtliches Tumorgewebe wurde von zwei unabhängigen Pathologen (A.G. und A.H.) untersucht und klassifiziert. Dabei wurde das Patientengut in 39 Patienten mit einem papillären nicht invasiven (pTa), sowie 21 Patienten mit invasivem Urothelkarzinom (16 Patienten mit pT1 und 6 Patienten mit pT2) unterteilt. Lokale- und Fernmetastasen wurden durch klinische und radiologische Untersuchungen ausgeschlossen. Zudem wurde keine neoadjuvante Chemotherapie verabreicht. Das Tumor-Grading nach der WHO 1973 ergab in 18 Fällen G1, in 29 Fällen G2 und in 14 Fällen G3. Da die meisten Tumore vor dem Jahr 2004 diagnostiziert worden waren, hatten die Änderungen der neuen WHO-Klassifikationen von 2004 keinen Einfluss.

Alle Tumore zeigten histologisch einen typischen papillären Aufbau mit zahlreichen Architekturstörungen und zytologischen Atypien, wie Kerngrößenschwankungen, Kernpolaritätsstörungen und erhöhter mitotischer Aktivität. Invasive Tumore zeigten

zumindest teilweise solide infiltrierende Bereiche, die mit einer desmoplastischen Stromareaktion der Lamina propria oder des Detrusormuskels einhergingen.

Alle Fälle wurden auf eine mögliche FGFR3-Mutation hin untersucht. 28 Patienten wurden dabei positiv und 33 negativ getestet. Untersucht wurden die Hotspot-Mutationsregionen des FGFR3-Gens mittels Snapshot-PCR.

Folgende Daten wurden erhoben:

- **Geschlecht:** 13 weibliche, 48 männliche Patienten.
- **Alter bei Diagnose:** Aus dem Diagnosedatum und dem Geburtsdatum der Patienten wurde das Alter des Patienten bei Erstdiagnose errechnet. Bei den Patienten war dies im Durchschnitt 70,7 Jahre (41–94 Jahre).
- **FGFR3-Mutationsstatus:** Nach der Mutationsanalyse ergab sich eine Verteilung von 28 Patienten mit und 33 Patienten ohne Mutation.
- **T-Stadium:** 39 pTa-, 16 pT1- und 6 pT2-Tumoren.
- **Grading:** Da der überwiegende Anteil der Diagnosen vor dem Jahr 2004 gestellt wurde und in den meisten in der Diskussion erwähnten Quellen diese genutzt wird, wurde nach der alten WHO-Klassifikation von 1973 unterschieden.
- **Tumorangiogenese:** Zur Quantifizierung der Angiogenese wurden die Werte des MVC (Microvessel Count) und VSA (Vascular Density) der Gefäßmarker CD31 und Faktor VIII mittels Immunhistochemie ermittelt, dichotomisiert, nach Median unterschieden und in 2 Gruppen unterteilt (hohe vs. niedrige Gefäßdichte/Zahl).
- **Proteinexpression:** Mittels TMA wurde die Proteinexpression (FGF-1, FGF-2, FGFR1, FGFR3, FGFR4 und ICAM-1) der Tumorzellen ermittelt und in positive und negative Expression unterteilt.
- **Rezidiv-freies Überleben:** Der Nachbeobachtungszeitraum erstreckte sich über 16-132 Monate (Median 74 Monaten). Es wurde analysiert ob und nach welcher Zeit (Monate nach Erstdiagnose) ein oder mehrere Rezidive auftraten. Ausgangspunkt war der Monat der Erstdiagnose.
- **Gesamtüberleben:** Im oben genannten Nachbeobachtungszeitraum wurde das Überleben in Monaten nach Erstdiagnose bis zu einem definierten Zeitpunkt (Meldung Tumorzentrum 2007/2008) angegeben und Todesfälle notiert mit der Unterscheidung ob der Tod tumorspezifisch oder nicht bzw. unbekannt war. Ausgangspunkt war der Diagnosemonat.

2.1.2 Grundmaterialien

3-Amino-9-Ethylcarbazol, AEC Chromogen

Agarose

Aqua destilliert

Alufolie

Array-Schablone

Bovines Serum Albumin, BSA

Calciumchlorid, CaCl_2

CD31

Deckglas

Dimethylsulfoxid, DMSO

Desoxyribonukleosid-Trisphosphat, dNTP

Desoxyribonukleinsäure, DNA

Entellan

Eosin (0.5%)

Eppendorfcup

Ethanol 96%, 70%

Ethylendiamintetraacetat, EDTA

Exonuklease I

Falcontube

Fibroblast-Growth-Faktor 1, 2 Antikörper

Fibroblast-Growth-Faktor-Rezeptor 1,3 und 4 Antikörper

Formaldehyd (4%ige Lösung)

Gewebeblöcke

Hämatoxylin

Hi-Di Formamid

ICAM-1

Kaliumchlorid, KCl

Kaliumdihydrogenphosphat, KH_2PO_4

Levamisol

120 LIZ Size Standard

Lochstanzer

Magnesiumchlorid, MgCl_2

Metallförmchen
Methanol
Methylenblau
Monohydratpulver
Nadeln (1er)
Natriumazid, NaN_3
Natriumchlorid, NaCl
Natriumhydroxid, NaOH
Natriumhydrogenphosphat
Natriumzitat
Objektträger
Phosphate Buffered Saline, PBS
Primer Multi FGFR3
Proteinase K
Puffer AW, AL
Sequenzierungspuffer
Shrimp Alkaline Phosphatase, SAP
SNaPshot-Primer, diverse
Sterile Nadeln
Taq-Polymerase
Tris-Acetat-EDTA-Puffer (TAE)
TRIZMA-HCl
Trypsin
Tween 20 (0.5%)
vonWillebrand Faktor
Wasser, H_2O
Wasserstoffperoxid, H_2O_2
Xylol
Zitrat-Azid-Monohydrat

2.1.3 Reagenzien und Lösungen

2.1.3.1 Allgemeine Lösungen

EDTA, 0,5 M (pH 8,0):

Ethylendiamintetraacetat	73,1g
Wasser	800 mL

- rühren, mit NaOH pH 8,0 einstellen, mit Aqua dest. auf 1000mL auffüllen

Ethanol, 96% bzw. 70%ig:

Ethanol abs.	960 mL bzw. 700 mL
Aqua dest.	40 mL bzw. 300 mL

- zusammenmischen auf 1.000 mL

2.1.3.2 Lösungen für die HE-Färbung von Paraffinschnitten

Hämatoxylin (0,5%):

Monohydratpulver	0,5 g
Ethanol	10,0 mL

- lösen

Wasser	90,0 mL
--------	---------

- verdünnen, Reifezeit 5 Wochen

Eosin (0,5%): gebrauchsfertig (Merck, Darmstadt)

2.1.3.3 Lösungen für die DNA-Isolation aus Paraffinmaterial

70% Ethanol:

Ethanol abs.	700,0 mL
Wasser	300,0 mL

Puffer AW: 190mL Ethanol abs. in Stammlösung (Qiagen, Hilden)

Puffer AL: gebrauchsfertig (Qiagen, Hilden)

Digestionspuffer:

Tris (pH 8,5)	250,0 µL
EDTA (pH 8,0)	250,0 µL
Tween 20 (0.5%)	100,0 µL
Wasser	ad 50 mL

- aliquotieren, autoklavieren, Lagerung bei Raumtemperatur

Proteinase K: gebrauchsfertig (Merck, Darmstadt)

2.1.3.4 Material für die immunhistochemischen Färbungen

2.1.3.4.1 Puffer und Substratlösungen

AP - Substratlösung:

1. Blockierungs - Lösung (ABC / Pox - Methode):
100 ml Methanol + 4 ml 30%ige H₂O₂
2. BSA / PBS bzw. BSA / TRIS 1%:
0,5 g BSA in 50 ml PBS bzw. TRIS - Puffer (pH 6,7) lösen
3. Citrat - Puffer (pH 3,8):
25,5 g Citrat Acid Monohydrat + 23,5 g tri - Natriumcitrat in 400 ml aqua bidest. lösen
4. Entwicklungslösung (ABC / Pox-Methode):
AEC Chromogen (Peroxidase Substrate Ready to use Kit AEC SK - 4200)
5. Phosphat - Puffer (Phosphate Buffered Saline [PBS - Puffer]) (pH 7,4):
10 - fach konzentrierte Lösung:
8,7 g Natriumchlorid + 0,2 g Kaliumchlorid + 0,2 g Kalium – dihydrogenphosphat+
1,15 g di - Natriumhydrogenphosphat ad 100 ml aqua bidest. pH 7,4 einstellen
Gebrauchslösung: konzentrierte Lösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen und
pH - Wert (7,4) kontrollieren
6. TRIS - Puffer (pH 7,6) Stammlösung:
8,78 g Natriumchlorid + 6,85 g TRIZMA®HCl + 0,9 g TRIS ad 1000 ml aqua bidest.
pH 7,6 einstellen
Gebrauchslösung: Stammlösung 1:10 mit aqua bidest. verdünnen

7. Trypsinlösung:

300 mg Trypsin + 300 mg CaCl_2 in 300 ml 0,05 molarem TRIS - Pufferlösen und auf pH 7,8 einstellen

2.1.3.5 Antikörper und Antikörperkomplexe

2.1.3.5.1 von Willebrand Faktor/Faktor VIII

Der von Willebrand-Faktor (vWF) ist ein Glykoprotein mit multimerer Struktur und einer relativen Molekülmasse von 500 kDa bis hin zu mehr als 10.000 kDa. Damit zählt er zu den größten löslichen Plasmaproteinen des Menschen (Ruggeri et Ware 1993). Das primäre Produkt des auf Chromosom 12p13.2 lokalisierten von Willebrand - Faktor - Gens ist ein Protein bestehend aus 2813 Aminosäuren. Dieses besteht aus einem Signalpeptid mit 22 Aminosäuren, einem Propeptid mit 741 Aminosäuren und einem maturen vWF - Molekül mit 2050 Aminosäuren (Rodeghiero, 2002). Die Expression erfolgt gewebespezifisch und ist auf Endothelzellen und Megakaryozyten begrenzt (Ruggeri, 1993). Der vWF dient im Plasma als Träger für den Faktor VIII und schützt das für die Koagulation verantwortliche Coenzym gegen proteolytischen Abbau. Außerdem ist er bei Gefäßwandläsionen für Thrombozytenadhäsion und -aggregation mitverantwortlich. Zusätzlich kommt vWF auch in den Weibel – Pallade - Korpuskeln der Endothelzellen, im α - Granulum der Megakaryozyten und den hieraus entstehenden Thrombozyten sowie in der subendothelialen Matrix der Gefäßwand vor. Er stellt damit einen idealen Marker für Endothelzellen bzw. Gefäßwände dar (Weidner et al. 1991). Zur immunhistochemischen Detektion des Antigens wurde ein polyklonaler Antikörper (Polyclonal Rabbit, Anti Human, Von Willebrand Faktor) der Firma DakoCytomation verwendet. Es liegt als gereinigte Immunglobulinfraktion des Kaninchen Anti-Serums in flüssiger Form vor in 0,1 mol/L NaCl und 15mmol/L NaN_3 .

2.1.3.5.2 CD 31 (PECAM, Platelet endothelial cell adhesion molecule)

CD 31 gehört zur Superfamilie der Immunglobuline und ist ein Einketten-Transmembranprotein vom Typ 1 mit einer relativen Molekülmasse von ca. 135 kDa. CD 31 geht sowohl homophile als auch heterophile Bindungen ein. Die homogene Bindungsstelle dient der transendothelialen Diapedese und Passage von Leukozyten durch die extrazelluläre Membran. Dabei resultiert die Ligations von CD31 an die Oberflächen von Leukozyten. Die heterogenen Anteile enthalten Integrine $\alpha_v\beta_3$, Heparin und Heparansulfat-Glykosaminoglykane. Deren Interaktion spielt eine gesonderte Rolle bei der Migration von Monozyten durch die Basalmembran des Subendothels (Muller et al. 1997).

Die Expression erfolgt auf allen Endothelzellen, einschließlich denen von Arterien, Arteriolen, Venen, Venolen und nicht sinusoiden Kapillaren. Außerdem wird CD 31 auch geringfügig auf den Oberflächen von Megakaryozyten, Thrombozyten, Myeloidzellen, natürlichen Killerzellen und einigen Unterarten von T-Zellen sowie auf den Vorläufern von B-Zellen exprimiert (Muller et al. 1997). Im Gegensatz zum Antikörper gegen Faktor VIII, der kleinste Kapillaren nicht markiert, färbt der CD 31-Antikörper eindeutig mehr vaskuläre Strukturen an. Er ist der sensitivste pan-endotheliale Antikörper, mit dem die meisten Gefäße erkannt werden können, zeichnet sich aber durch geringe Spezifität aus, da auch Reaktionen mit Plasmazellen zu beobachten sind (Gasparini, 1997). Ein monoklonaler Antikörper der Firma DakoCytomation (Monoclonal Mouse Anti-Human CD31, Endothelial Cell, Clone JC70A) wurde zur immunhistochemischen Detektion von CD31 verwendet. Er wird in flüssiger Form als Zellkulturüberstand geliefert, wurde gegen 0,05 mol/L Tris/HCl, pH-Wert 7,2 dialysiert und enthält 15 mmol/L NaN_3 .

2.1.3.5.3 ICAM-1 (CD54)

Das interzelluläre Adhäsionsmolekül ICAM-1 ist ein Membranprotein aus der Immunglobulinsuperfamilie. Es wird von Endothelzellen und verschiedenen Zellen des Immunsystems exprimiert. ICAM-1 vermittelt den Durchtritt von Lymphozyten und Monozyten aus den Blutgefäßen heraus. Zusätzlich ist es für die Aktivierung der T-Lymphozyten mitverantwortlich. Diese wird dabei erst durch die Adhäsion möglich die mittels Bindung des "Lymphocyte function-associated antigen" (LFA)-1 an ICAM-1 erfolgt

(Springer, 1990). In der vorliegenden Arbeit wurde ein ICAM-1 Antikörper (rICAM-1 CD54, C2409-47F) der Firma NeoMarkers (USA) verwendet.

2.1.3.5.4 FGFR1, FGFR3, FGFR4, FGF-1, FGF-2

Die Familie der Fibroblasten-Wachstums-Faktoren und -Rezeptoren wurde im vorherigen Kapitel eingehend beschrieben. In der vorliegenden Arbeit wurden die FGF-1, FGF-2, FGFR1 und FGFR4 Antikörper der Firma Santa Cruz Biotechnology (Deutschland) und der FGFR3 Antikörper der Firma Spring Bioscience Corporation (USA) verwendet.

2.1.4 Material für die FGFR3-Mutationsanalyse

Primer	Primersequenz	Strang	Wild-typ	Mutant	c (pmol / μ L)
R248C	5`-T46CGTCATCTGCCCCACAGAG-3`	sense	C	T	2,0
S249C	5`-T36TCTGCCCCACAGAGCGCT-3`	sense	C	G	1,2
S249C	5`-T28TCTGCCCCACAGAGCGCT-3`	sense	C	G	1,2
G472C	5`-T29GGTGGAGGCTGACGAGGCG-3`	sense	G	T	0,4
Y375C	5`-T43ACGAGGCGGGCAGTGTGT-3`	sense	A	G	0,6
A393E	5`-T34CCTGTTCATCCTGGTGGTGG-3`	sense	C	A	2,4
K652E/Q	5`-T50GCACAACCTCGACTACTACAAG-3`	sense	A	G/C	1,2
K652M/T	5`-T20CACAACCTCGACTACTACAAGA-3`	sense	A	T/C	0,8

Tab. 1: SNaPshot-Primer zur Detektion der FGFR3-Mutationen, Legende: c = Konzentration

Für Exon 7	5`-AGTGGCGGTGGTGGTGAGGGAG-3` und 5`-GCACCGCCGTCTGGTTGG-3`
Für Exon 10	5`-CAACGCCCATGTCTTTGCAG-3` und 5`-AGGCGGCAGAGCGTCACAG-3`
Für Exon 15	5`-GACCGAGGACAACGTGATG-3` und 5`-GTGTGGGAAGGCGGTGTTG-3`

Tab. 2: Primer für die Multiplex-PCR; diese Exons beinhalten alle bisher entdeckten FGFR3-Mutationen

PCR-Reagenzien (Gesamtvolumen 50µL)

H ₂ O	28,5 µL
DMSO (mit H ₂ O 1:1 verdünnt)	5 µL
MgCl ₂	3 µL
10xPuffer	5 µl
dNTPs	1µL
Primer Multi FGFR3	1 µL
Taq Polymerase	1,5 µL
DNA	5 µL

Mastermix: µL-Angaben jeweils für eine Reaktion

SNaPshot-Reaktion (Volumen 10µL)

PCR Produkte (aus Mehrfach-PCR, s.o.)	2 µL
Ready Reaction Mix	2,5 µL
Sequenzierungspuffer	1 x
SNaPshot-Primer	Konzentration nach obiger Tabelle: 0,4 bis 2,4 pmol/L

Gel-Ansatz (2,5%iges Agarosegel)

Agarose	2,5g
TAE-Puffer	100ml

ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

ABI PRISM 3100 Avant Genetic Analyzer (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

GeneScan Analysis Software Version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.1.5 Fotodokumentation

AxioCam MRm (Carls Zeiss MicroImaging, Göttingen)

2.1.6 Datendokumentation und Auswertung am Computer

Tabellenkalkulationsprogramm Excel 2004 (Microsoft ® Corporation, Redmond, WA, USA)

Statistische Analyseprogramm SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA)

GeneScan Analysis Software Version 3.7 (Applied Biosystems, Foster City, CA, USA)

2.2 Methoden

2.2.1 Herstellung von Paraffinschnitten

Die im pathologischen Institut der Universitätsklinik Regensburg eingesandten Präparate wurden in 4%iger Formalinlösung fixiert und anschliessend in Paraffinblöcken verarbeitet und archiviert. Von den Paraffinblöcken wurden je nach Gewebemenge 6 bis 18 Schnitte mit einer Schichtdicke von 10 µm und je ein Schnitt mit 3 µm Dicke hergestellt. Die Schnitte wurden in ein 35°C warmes Wasserbad gebracht und auf zuvor mit Alkohol gereinigte Objektträger aufgezogen und bei 42-45°C im Brutschrank getrocknet.

2.2.2 Entparaffinieren der Gewebeschnitte

Für die folgenden HE-Färbung und Mikrodisektion wurde das Material entparaffiniert. Die trockenen Schnitte wurden dazu auf einem Ständer für 30 Min bei 72°C inkubiert, wodurch das geschmolzene Paraffin abliess. Zur kompletten Entparaffinierung standen die Schnitte 2 -5 min in Xylol und durchliefen anschliessend eine absteigende Alkoholreihe (jeweils 1-2min). Nun konnten die Schnitte für die Mikrodisektion verwendet werden oder bis zu einer Woche in 70% Alkohol gelagert werden.

2.2.3 HE-Färbung der Schnitte

- Protokoll:
- 10 min Xylol
- Dehydrierung in absteigender Alkoholreihe (100%, 96%, 80%, 60%)
- 1min in destilliertem Wasser
- 10 min in Hämatoxylin
- 25 min Bläuen in Leitungswasser (warm)
- wenige Sekunden in Eosin
- Spülen in Leitungswasser (kalt, 2x)
- aufsteigende Alkoholreihe (60%, 80%, 96%, 100%)
- Xylol
- Eindeckeln mit Entellan und Deckglas

Die 3µm dicken Schnitte wurden mit Hämatoxylin-Eosin (HE) gefärbt. Die histologischen Strukturen konnten in dieser Färbung gut beurteilt werden und dienten als Referenz für die Mikrodissektion.

2.2.4 FGFR3-Mutationsanalyse

Bei allen Tumoren wurde eine FGFR3-Mutationsanalyse durchgeführt. Dazu wurden Mutationen im Exon 7, 10 und 15 des FGFR3-Gen mithilfe der Snapshot PCR Methode analysiert. Dies wurde nach der Methode von van Oers et al. durchgeführt (van Oers et al. 2005).

2.2.4.1 Mikrodissektion der Tumorareale, Proteinase-K-Verdau und DNA-Isolierung

Die Technik der Mikrodissektion ermöglicht es auf einem histologischen Schnitt selektiv bestimmte Gewebebezirke zu isolieren. Dabei wurde bei schwacher Vergrößerung das gewünschte Tumorareal bzw. tumorfreies Normalgewebe von einem Pathologen mit einem Folienstift markiert (A.G.). Anschliessend wurden die 10 µm dicken Schnitte in Methylenblau angefärbt und das entsprechende Areal unter dem Mikroskop aufgesucht. Mittels einer sterilen Nadel konnte nun das gewünschte Gewebe abgekratzt werden. Das so erhaltene Material wurde in ein 0,5 mL bzw. 1,5 mL Eppendorf-Cup aufgenommen, welches 180 µL Digestionspuffer enthielt. Dem Digestionspuffer mit den enthaltenden Gewebestückchen wurden 40 µL gebrauchsfertige Proteinase K und Tissue-Lysepuffer hinzugegeben. Die Suspension wurde anschliessend gut durchgemischt, abzentrifugiert und bei 55°C über Nacht im Thermoblock inkubiert. Die DNA-Isolierung erfolgte anschliessend vollautomatisch mit dem MagNa Pure Isolator der Firma Roche (Diagnostics AG) mittels des LC-DNA-Isolationskit II (tissue). Die DNA-Konzentrationsbestimmung wurde mit dem Nanodrop der Firma Peqlab durchgeführt.

Vorgehensweise:

1. Herstellung von drei Schnitten pro Paraffinblock
2. Mikrodissektion
 - Schnitte für 30 min in Brutschrank bei 72°C (Schmelzen des Paraffins)
 - Absteigende Alkoholreihe (2 mal Xylol jeweils 10 min, 100% Alk., 96% Alk., 70% Alk. Jeweils für 2 min)
 - Spülen mit Aqua dest.
 - Anfärbung mit Methylenblau
 - Mikroskop: Abkratzen von Gewebe aus den vorher vom Pathologen markierten Bereichen (Tumor/Normalgewebe)
3. Zellen mischen mit Proteinase K und Tissue-Lysepuffer
4. Inkubieren über Nacht bei 55°C
5. DNA Isolierung vollautomatisch mit dem MagNa Pure Isolator der Firma Roche (Diagnostics AG) mit dem LC DNA Isolationskit II (tissue)
6. DNA Konzentrationsbestimmung mit dem Nanodrop der Firma Peqlab

2.2.4.2 Amplifikation von DNA mittels PCR

Die PCR ermöglicht die Vervielfältigung einer spezifischen DNA-Sequenz *in vitro*. Dazu wird ein Primerpaar, welches die gewünschte Zielsequenz jeweils auf der 3'-Seite des Matrixstranges flankiert, eine Polymerase und die vier verschiedenen Desoxyribonukleosid-Triphosphate in ausreichender Menge benötigt. Als Polymerase wird die sogenannte Taq-Polymerase eingesetzt, da dieses Enzym besonders hitzestabil ist und nicht nach jedem Zyklus erneut hinzugefügt werden muss, sondern den Denaturierungsprozess übersteht. Seine optimale Aktivität entfaltet das Enzym bei 72°C. Durch eine hohe Konzentration an Primern wird ein Wiederanlagern von zwei komplementären Strängen der Ausgangs-DNA während der Hybridisierung verhindert. Durch die exakte Bindung der Primer an den komplementären DNA-Abschnitt ist eine hohe Spezifität gewährleistet.

Der PCR-Zyklus besteht aus drei Einzelschritten:

1. Strangtrennung (Denaturierung) der Ausgangs-DNA durch kurzes Erhitzen auf eine Temperatur von 94°C (1 min)
2. Hybridisierung der Primer bei einer bestimmten Temperatur, je nach Primer 50-70°C
3. Verlängerung der Primer (Elongation) bei 72°C durch Anheften der komplementären Nukleotide an das freie 3'-OH-Ende und damit in Richtung der Zielsequenz

Bei der FGFR3-Mutationsanalyse werden in einer Multiplex-PCR gleichzeitig drei Regionen des FGF-Rezeptors 3 amplifiziert, die alle bis jetzt entdeckten FGFR3-Mutationen beinhalten. Für alle drei Regionen wurde erfolgreich eine Mehrfach-Reaktion angesetzt. Als Nächstes folgte nun die eigentliche FGFR3-Mutationsanalyse. Dazu wurde der ABI PRISM SNaPshot Multiplex Kit entsprechend den Anweisungen des Herstellers angewandt. Die Methode basiert auf der Didesoxy-Einzelbasen-Erweiterung von unbekannten Oligonukleotidprimern. Die SNaPshot-Primer sind im Kapitel 2.1.4 dargestellt. Nach Behandlung mit Krabben-alkalischer Phosphatase, um die überschüssigen Didesoxynukleotid-Triphosphate zu entfernen, wurden die markierten Produkte im automatischen Sequenzierer ABI PRISM 3100 Genetic Analyzer (Applied Biosystems) aufgetrennt. Für die Datenanalyse wurde die Software von GeneScan Analysis Version 3.7 (Applied Biosystems) gebraucht.

2.2.4.3 Protokoll

1. PCR FGFR3 Region I, II, III

- Ansetzen des Mastermix vgl. Kapitel 2.1.4 (μ l-Angaben jeweils für eine Reaktion)
- Gesamtvolumen des Mastermixes beträgt 50 μ l. Die DNA-Konzentration für die PCR sollte bei 100mg/ μ l liegen. Das optimale DNA-Volumen kann mit H₂O im Mastermix eingestellt werden.
- Positiv-Kontrolle: Blut-DNA
- Negativ-Kontrolle: H₂O

2. Mehrfach-SNaPshot-Reaktion vgl. Kapitel 2.1.4 (Volumen 10 μ L)

3. PCR-Programm

- 5 min bei 95°C
- 44 Zyklen: 95°C 45 sec, 60°C 45 sec, 72°C 45 sec
- 10 min bei 72°C

4. Gel-Ansatz

- Herstellen von 2,5%igem Agarosegel, vgl. Kapitel 2.1.4
- + 1 μ l Stopppuffer und + 3 μ l PCR-Produkt
- In den ersten Slot 100 bp DNA-Leiter pipettieren, anschließend die Proben in die weiteren Taschen auftragen.
- Laufzeit 60 min bei 110 Volt
- Endprodukt aus PCR: Exon 7: 160 bp, Exon 10:138 bp, Exon 15:115 bp

5. Verdau mit Shrimp Alkaline Phosphatase und Exonuklease I:

- Ansatz: 15µl PCR-Produkt+ 3µl SAP (1U/µl)+ 2µl ExoI (1U/µl)
- Gesamt: 20µl Verdauansatz
- Inkubation: 60 min bei 37°C
- 15 min bei 72°C, anschließend bei 4°C oder -20°C lagern, nach dem Verdau sind nur noch die reinen PCR-Produkte vorhanden

6. Snapshot Reaktion:

- Farbliche Kennzeichnung und Markierung der spezifischen Bereiche zur Erkennung der jeweiligen Struktur. Herstellung des Ansatzes erfolgt im Dunkeln.
- Ansatz: 2,5µl H₂O+ 1,0 µl SNAPSHOT Multiplex Primermix + 2,0 µl 5x Sequenzierung Buffer + 2,5µl SNAPSHOT Ready Reaktionmix (Alufolie, im Kühlschrank auftauen lassen)
- Gesamt: 8,0 µl + 2,0 µl verdautes PCR-Produkt
- PCR-Programm: 10 sec bei 96°C, Ramping 1,3 in 25 Zyklen (pro Zyklus wird die Temperatur um 1,3°C gesenkt), 40 sec bei 58,5°C

7. Verdau mit Shrimp Alkaline Phosphatase:

- Abbau aller Nebenprodukte
- Ansatz: 10µl PCR-Produkt + 1 µl SAP (1U/µl)
- Gesamt: 11µl Ansatz
- Inkubation: 60 min bei 37°C, 15 min bei 72°C

8. ABI PRISM 3100 Avant

- Produkte von Applied Systems. Ansätze werden in 96 Wellplatten pipettiert.
- Ansatz: 12 µl Hidi Formamid + 0,5 µl Standard 120-LIZ (zur internen Verrechnung, Erkennung bei welcher Größe der Peak erscheint) +1 µl SNAPSHOT Verdau Produkt

2.2.4.4 Beispielerggebnisse Mutationsanalyse

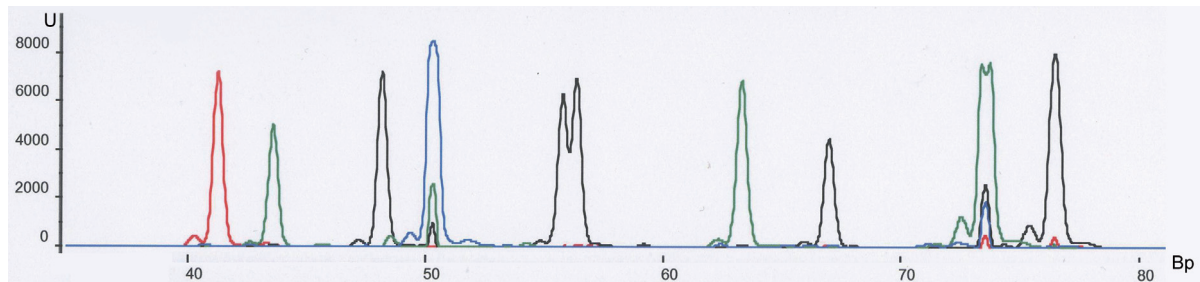


Abb. 4: Mutationsanalyse eines Patienten ohne FGFR3-Mutation (Wildtyp)

Legende: U=Units, Bp=Basenpaare

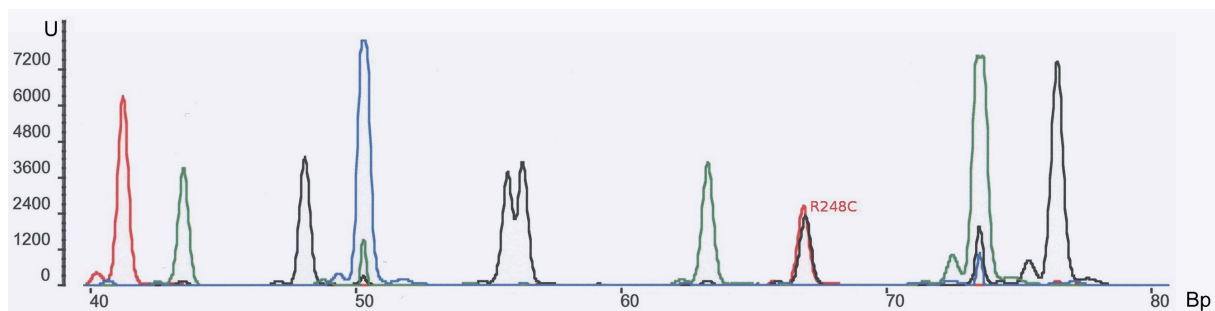


Abb. 5: Patient mit FGFR3-Mutation an der Stelle R248C

Legende: U=Units, Bp=Basenpaare

2.2.5 TMA (Tissue-Micro-Array)-Herstellung

Tissue-Micro-Arrays (TMA) ermöglichen das gezielte Untersuchen interessanter Regionen von Gewebeproben vieler Patienten auf einem Paraffinblock, was vor allem bei grossen Fallzahlen den finanziellen und arbeitsintensiven Aufwand verkleinert. In dieser Dissertation wurden die TMAs für die Beurteilung der Proteinexpression der Tumorzellen eingesetzt. Dafür wurden von allen vorliegenden Paraffinblöcken repräsentative HE-Schnitte hergestellt um während der histopathologischen Beurteilung repräsentative Areale mit einem Marker zu kennzeichnen. Die markierten Stellen wurden anschliessend auf dem Paraffinblock aufgesucht. Zeigte sich eine grosse Diskrepanz zwischen HE-Schnitt und Paraffinblock, wurde vor dem weiteren Vorgehen ein neuer HE-Schnitt angefertigt. Dann wurden nach unten beschriebenem Protokoll die relevanten Gewebebezirke zylinderförmig mithilfe einer

Handstanze ausgestanzt. Der Durchmesser der Stanzen betrug 1,2 mm. Die beschriebene Handstanze besitzt eine geschlossene Hohnadel mit einem Innendurchmesser von 1,2 mm, in der ein Stempel steckt.

Protokoll:

- Größtes Metallförmchen und leere Kapsel (kein Gewebe) mit Paraffin ausgießen, ca. 10 min. bei -15°C auf Kühlplatte legen, wenn abgekühlt überflüssiges Paraffin abkratzen und Kapsel beschriften
- Schablone mit drei 1er Nadeln an drei Ecklöchern auf Paraffinblock fixieren, benötigte Stanzen mit Lochstanzer ausstechen, Schablone abnehmen.
- vorbereitete, markierte HE-Schnitte und Blöcke auf Tablett vorsortieren
- Lochstanzer auf Pat.-Block aufsetzen, in markiertes Gewebeareal drücken, Stanzer mit Pat.-Material herausziehen
- Stanzen aus Pat.-Blöcken nach Muster (Arrayschablone) in Stanzlöcher geben
- wenn Stanzen zu tief in vorbereitete Löcher einsinken diese Löcher seitlich mit Nadel einstechen oder mit Paraffinstück unterfüttern (Gewebehöhe beachten)
- zusätzliches Stanzloch in Reihe 3 ganz links zur Orientierung bei Array befüllen (z.B. Kontrollgewebe)
- vorsichtig alle Stanzen mit flachem Gegenstand plan drücken und glattstreichen
- bei Ausgießstation Metallförmchen bei 65°C ca 5 min. vorwärmen, mit heißen Paraffin füllen
- Block richtig in die Metallform drücken (gut drücken zur Entfernung von Luftblasen)
- exakt 4 min. bei 65°C auf der Wärmeplatte stehen lassen, alternativ 20 min. bei 70°C in Wärmeschränk
- Block vorsichtig mit Paraffin begießen und langsam auf die Kühlplatte stellen, Vorsicht, Block nicht stoßen (verrutschen der Pat.-Stanzen im flüssigen Paraffin)
- auf der Kühlplatte ca. 10 min. bei ca. -15°C auskühlen lassen, überflüssiges Paraffin abkratzen und in Plastiktütchen aufbewahren

Vom fertigen Multiblock wurden 4 µm dicke Schnitte angefertigt, wobei der erste mit Hämatoxylin-Eosin gefärbt wurde, um die Qualität der Stanzen zu beurteilen. Sämtliche Stanzen wurden von einem Pathologen (A.G.) begutachtet und die jeweilige Histologie dokumentiert. Die fertigen Multiblöcke konnten anschliessend für die immunhistochemische Färbung für FGFR1, FGFR3, FGFR4, FGF-1, FGF-2 und ICAM-1 verwendet werden (vgl. Kapitel 2.2.6). Die immunhistochemisch gefärbten Schnitte wurden anschliessend von zwei unabhängigen Beobachtern (A.G. und A.H.) lichtmikroskopisch semiquantitativ analysiert (Zeiss AG). Die Intensität der immunhistochemischen Färbung wurde durch Auszählen der Anzahl positiver Zellen/ 10 high power fields (HPF) (400-fache Vergrößerung) ermittelt.

Nach anfänglicher Unterteilung der Fälle in verschiedene Expressionslevel wurde aufgrund der Fallzahlen in der statistischen Auswertung in vorhandene und fehlende Proteinexpression unterteilt.

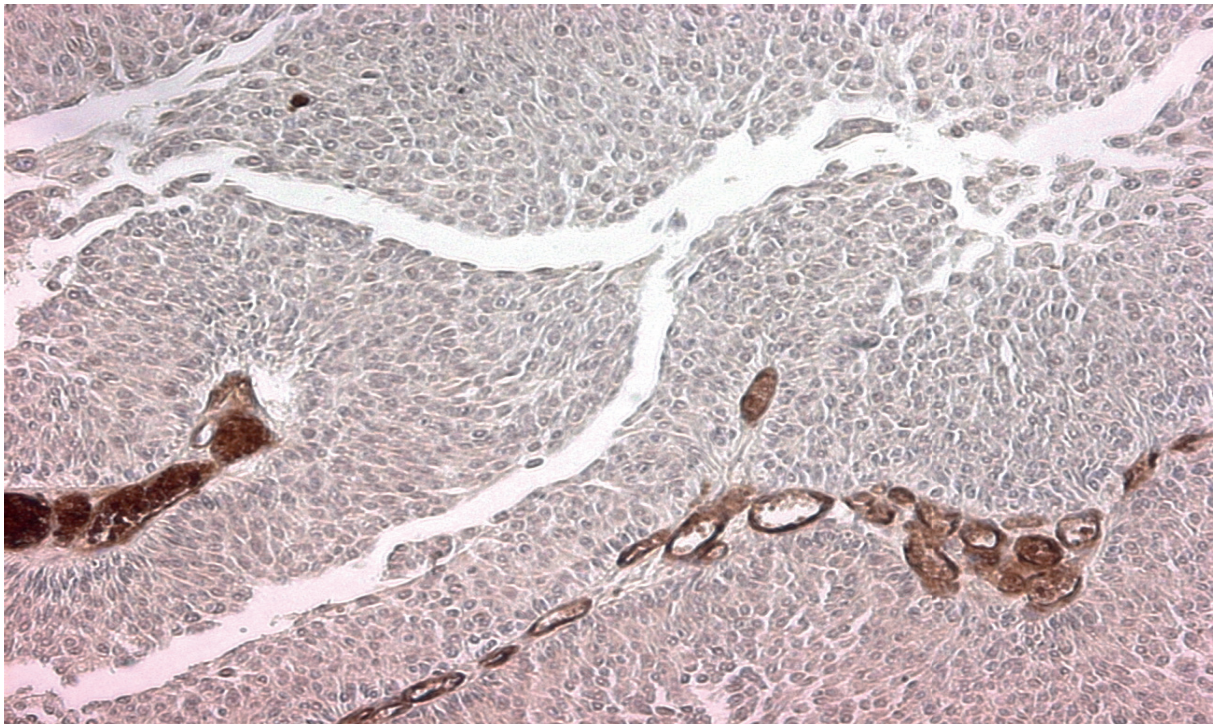
Bildtafeln der immunhistochemischen Analyse

Abb. 6: Proteinexpression FGF-1, mutiert (FGFR-3)

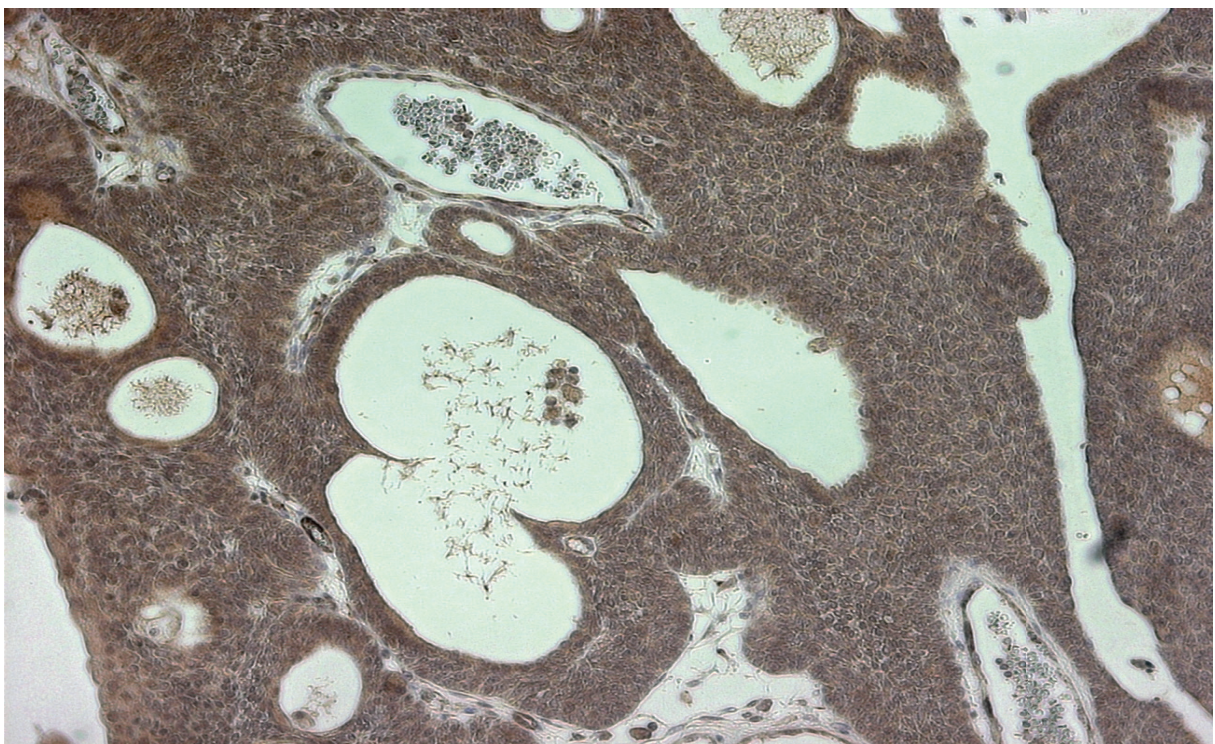


Abb. 7: Proteinexpression FGF-1, Wildtyp (FGFR-3)

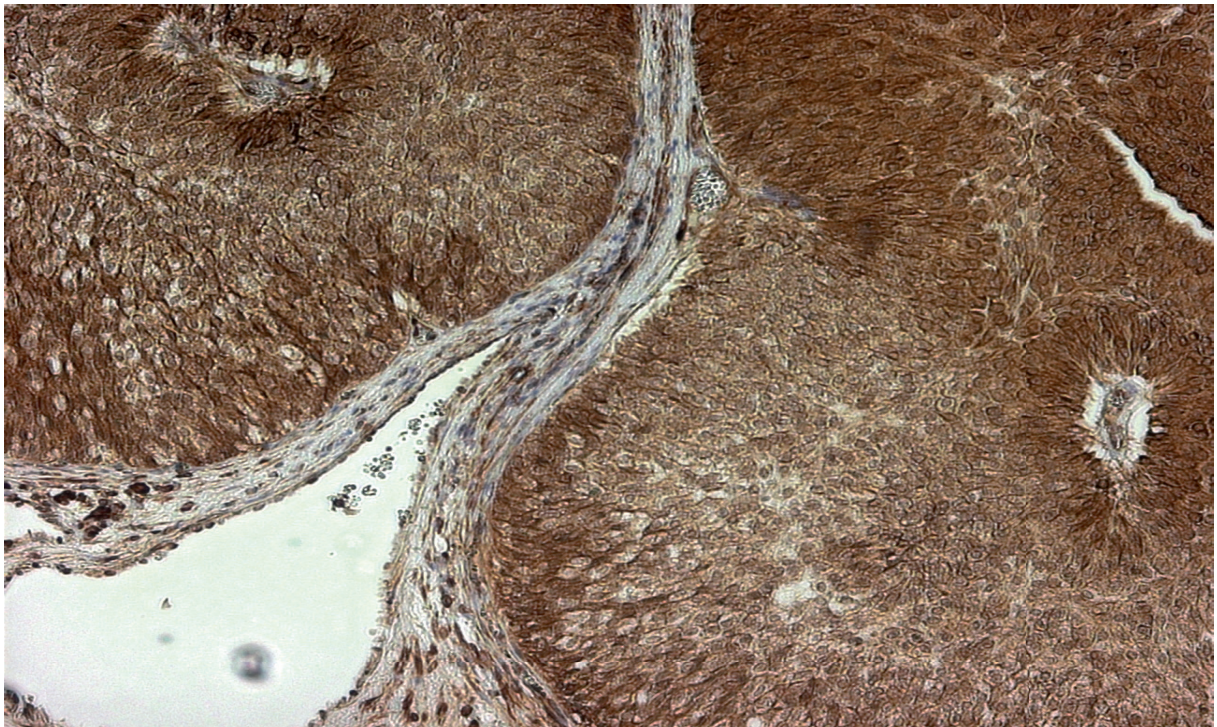


Abb. 8: Proteinexpression FGF-2, mutiert (FGFR-3)

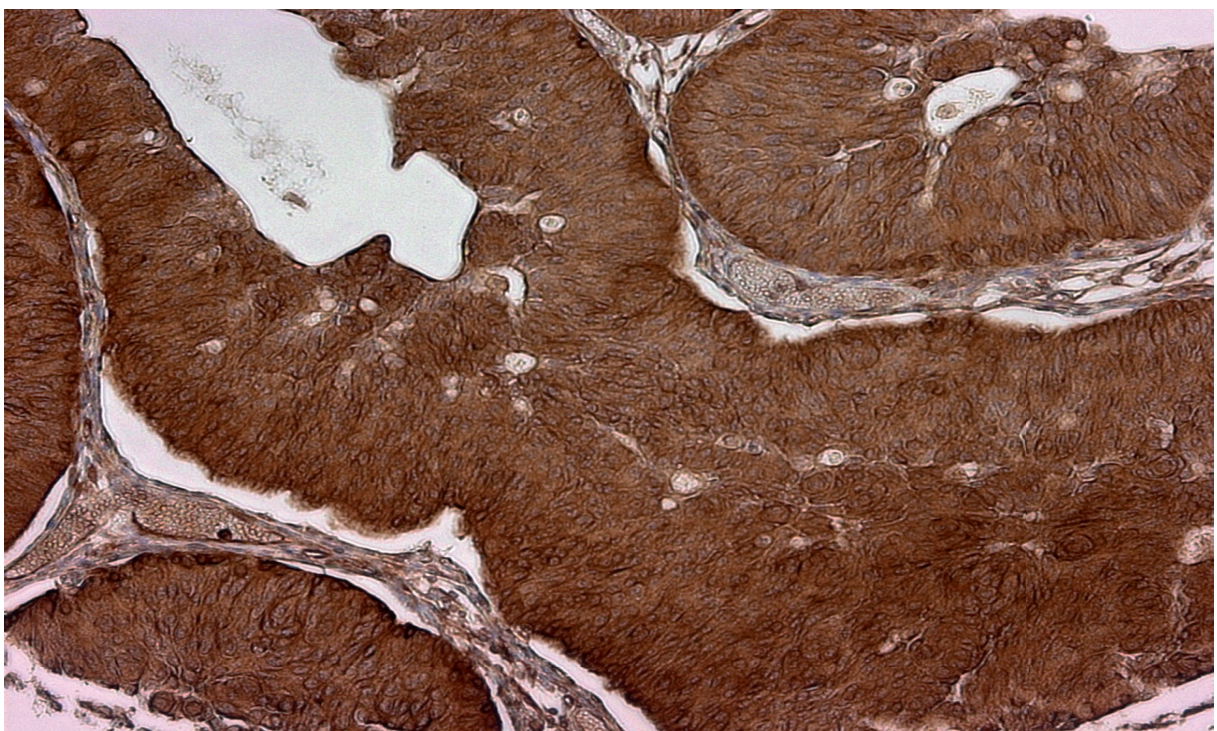


Abb. 9: Proteinexpression FGF-2, Wildtyp (FGFR-3)

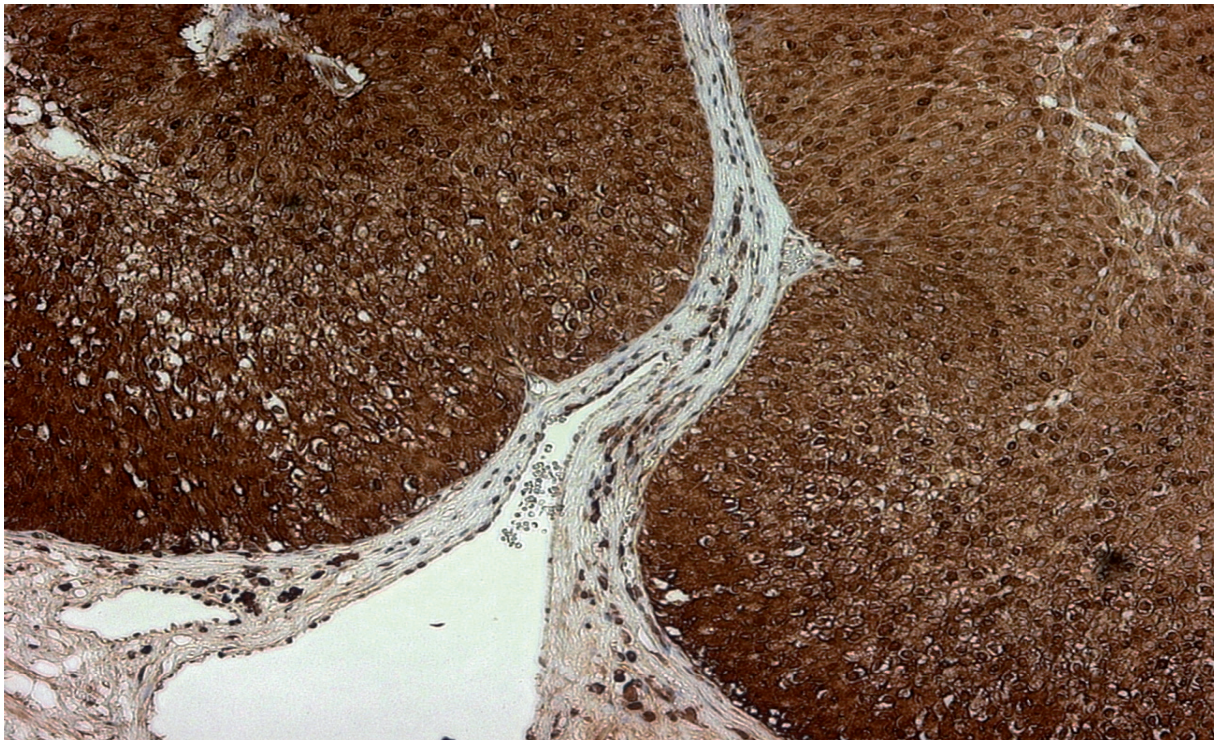


Abb. 10: Proteinexpression FGFR1, mutiert (FGFR-3)

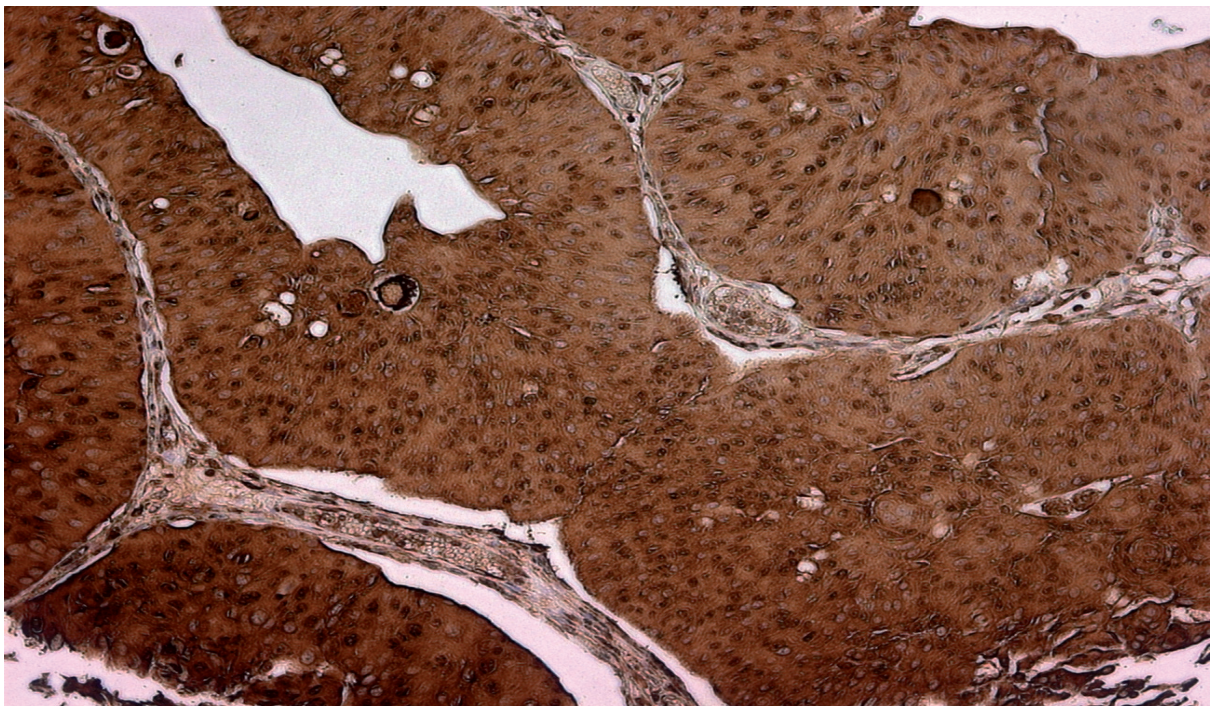


Abb. 11: Proteinexpression FGFR1, Wildtyp (FGFR-3)

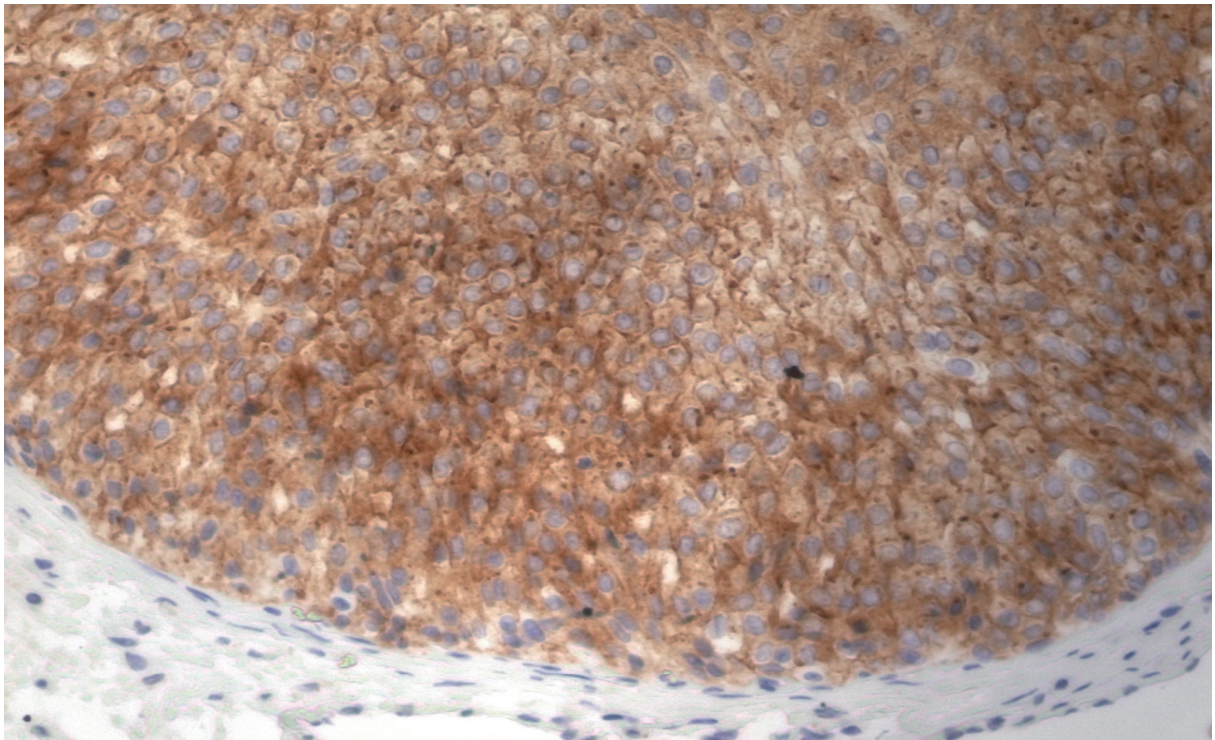


Abb. 12: Proteinexpression FGFR3, mutiert (FGFR-3)

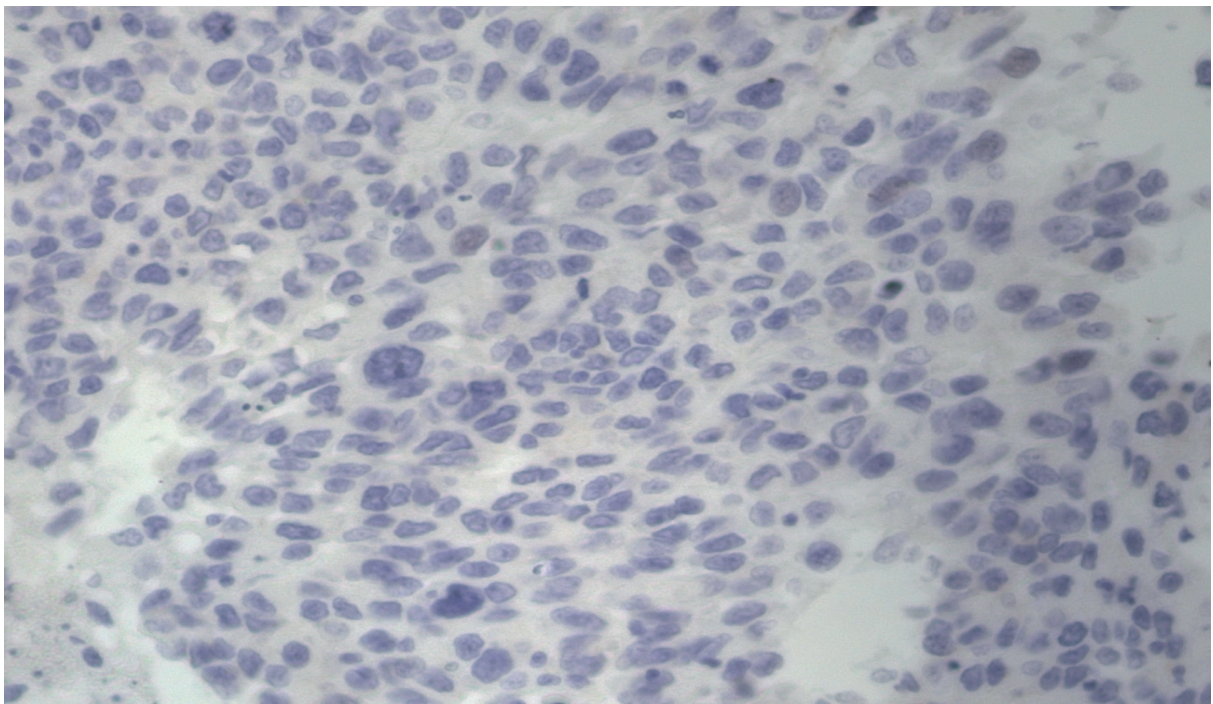


Abb. 13: Proteinexpression FGFR3, Wildtyp (FGFR-3)

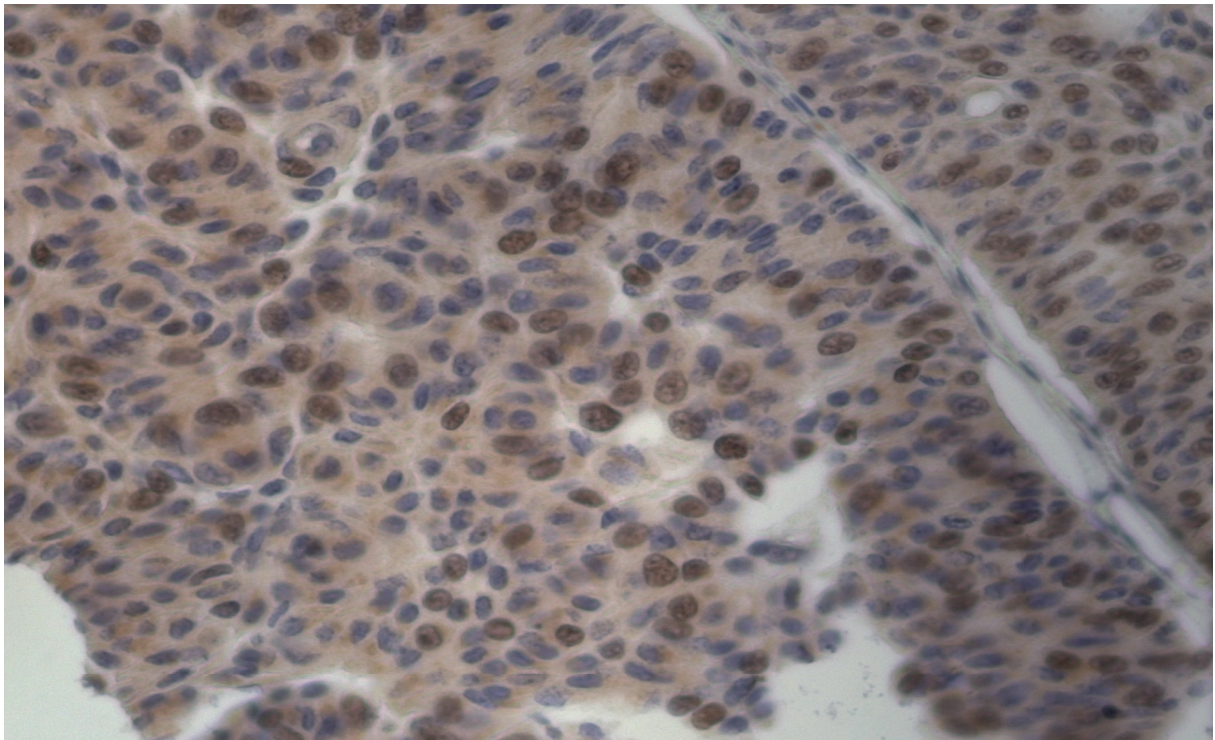


Abb. 14: Proteinexpression FGFR4, mutiert (FGFR-3)

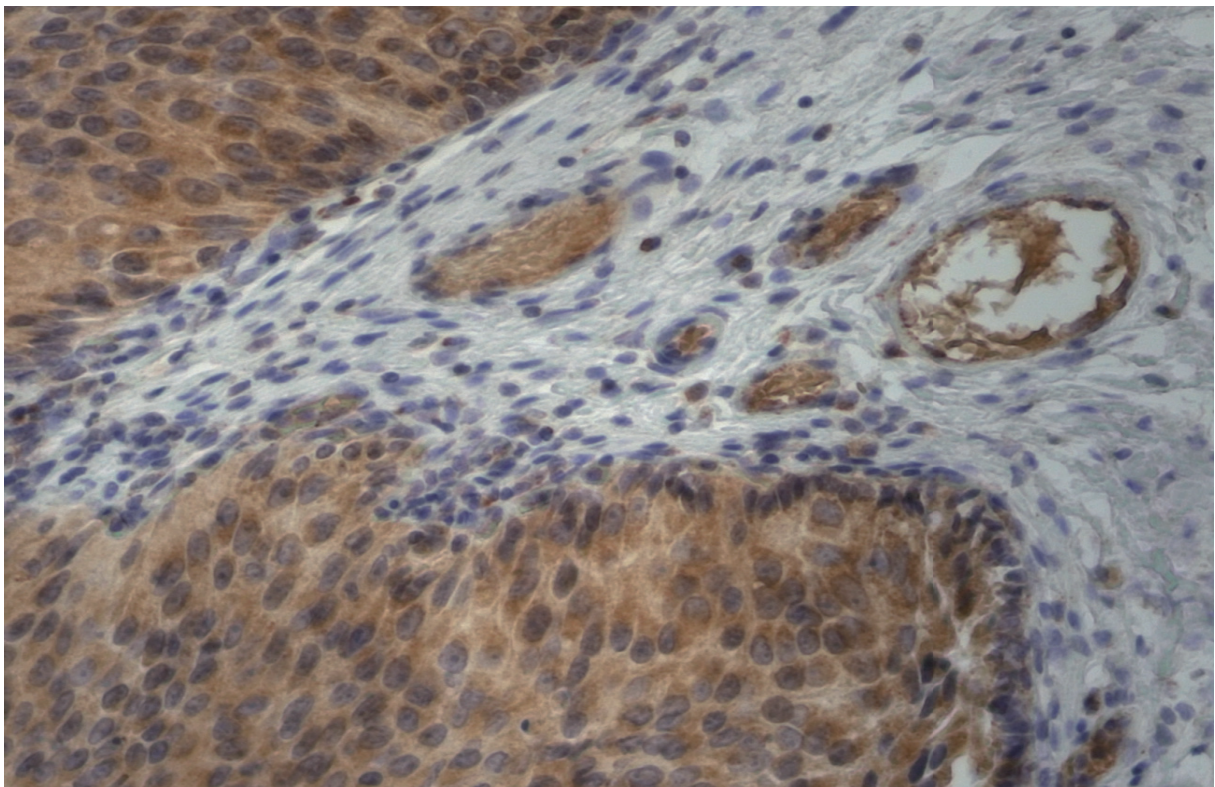


Abb. 15: Proteinexpression FGFR4, Wildtyp (FGFR-3)

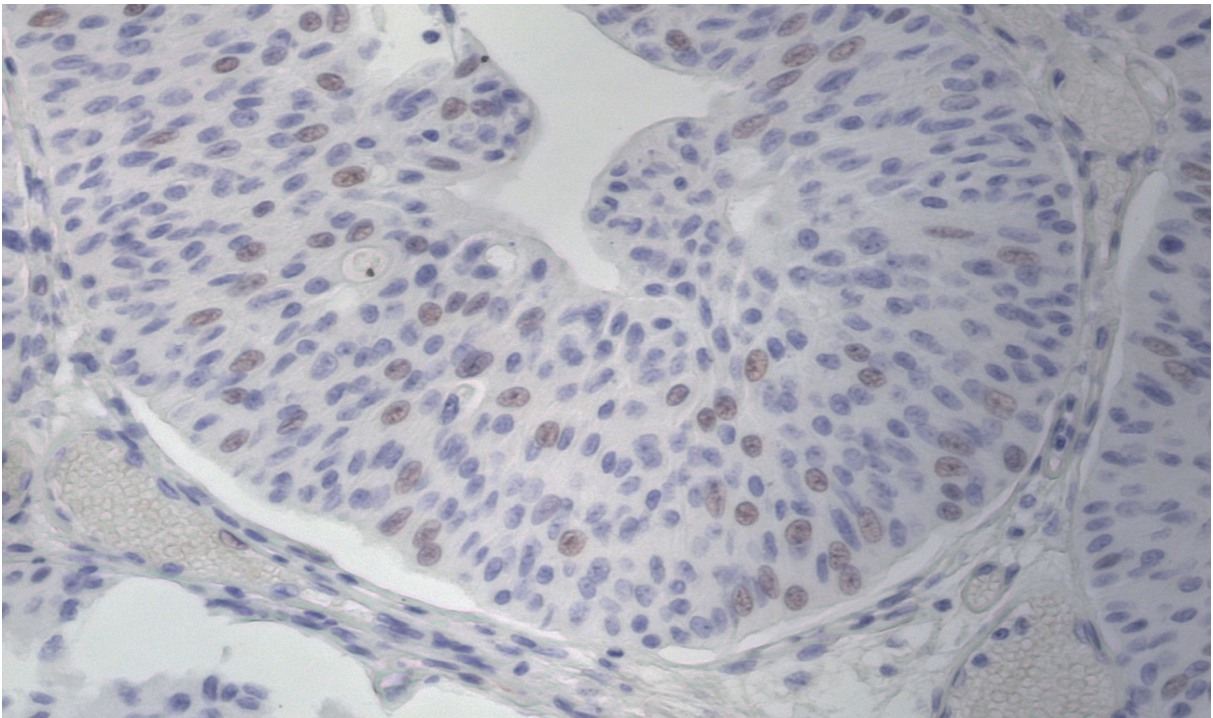


Abb. 16: Proteinexpression ICAM-1, mutiert (FGFR-3)

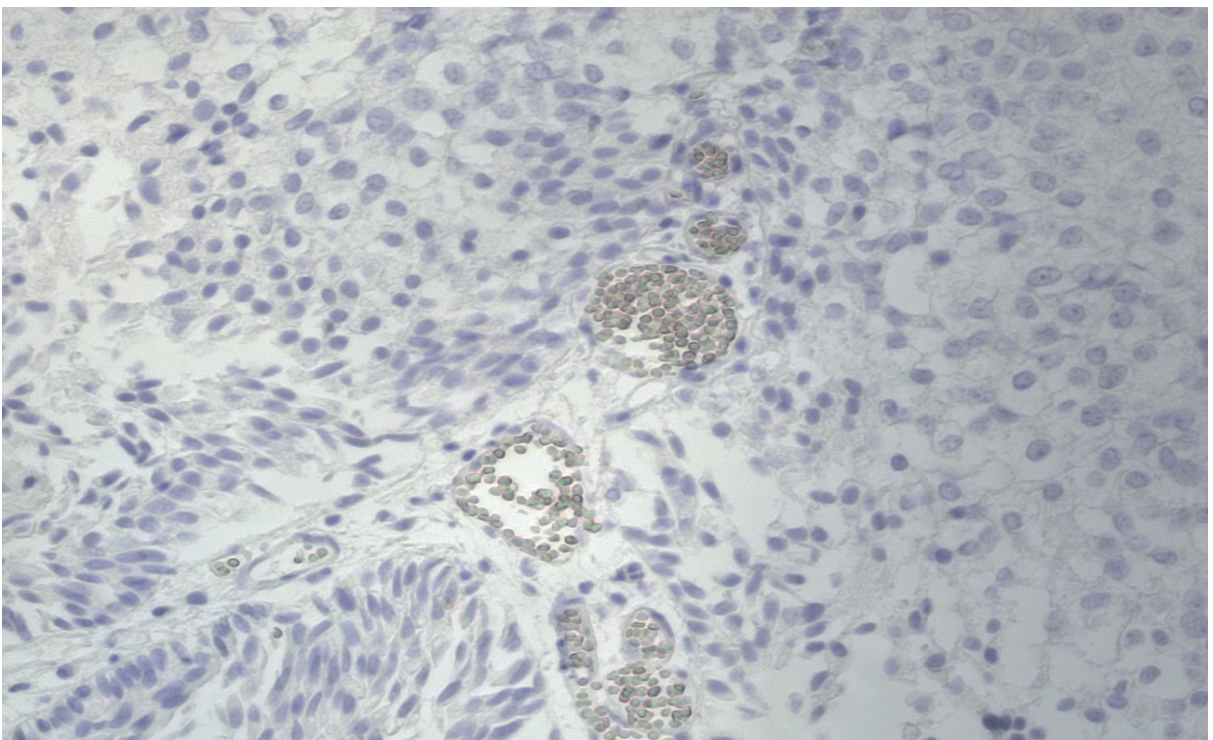


Abb. 17: Proteinexpression ICAM-1, Wildtyp (FGFR-3)

2.2.6 Immunhistochemie

2.2.6.1 Färbemethoden

1. Indirekte Methode

Bei der indirekten Methode bindet ein spezifischer, aber unkonjugierter Primärantikörper an das Antigen der Probe. Dadurch kann anschließend ein sogenannter Sekundärantikörper zu dem bereits gebundenen Primärantikörper gegeben werden. Der Sekundärantikörper ist spezifisch gegen die Tierspezies des Primärantikörpers gerichtet und ist mit einem Markerenzym oder Flouorchrom konjugiert.

2. ABC-Methode

Die ABC-Methode (Avidin-Biotin-Komplex) macht sich die Affinität von Avidin zu Biotin zunutze. Es werden hierbei Brückenantikörper verwendet, die mit Biotin konjugiert (biotinyliert) werden. Biotin ist ein wasserlösliches Vitamin, welches sich gut mit Antikörpern koppeln lässt. Es wird mit Multi-Link-Antikörpern gearbeitet, d.h. es liegt eine Lösung mit Brückenantikörper aus verschiedenen Spezies (z.B. Maus, Kaninchen, usw.) vor. An den biotinylierten Brückenantikörper bindet der ABC- Komplex. Der Komplex wird so produziert, dass an drei von vier möglichen Bindungsstellen des Avidins ein Molekül Biotin gebunden wird. An den Komplex ist ein Enzym gebunden, wobei zwischen alkalischer Phosphatase oder Peroxidase gewählt werden kann. Der immunologische Nachweis dieser Methode ist sehr sensitiv, jedoch muss dabei im Gewebe vorhandenes endogenes Biotin blockiert werden, da es sonst zu unspezifischen Bindungen und Hintergrundreaktionen kommt.

Als Ausgangsmaterial für die immunhistochemischen Färbungen wurden sowohl die Paraffinblöcke der einzelnen Tumorfälle als auch die Tissue-Micro-Array-Paraffinblöcke genutzt (s.o.).

2.2.6.2 Protokoll CD 31 (DAKO®)

- Schnitte über Nacht bei 37°C oder 30 min bei 70°C trocknen (immer auf SuperFrost OT)
- Entparaffinieren: Xylol (5 min, 5 min, 5-45 min), absteigende Alkohol-Reihe (2x5min Propanol, 2x5min 96% Ethanol, 5 min 70% Ethanol) → A.d. gründlich waschen
- Im Autoklav (Wasserbad) bei 96°C 30 min in TRS pH 9.0 erhitzen (Antigen-Demaskierung) → 30 min bei RT abkühlen (Target Retrieval Solution pH 9,0, Dako, REF S 2367)
- Waschen in A.d. → PBS
- 1h Blocken mit 10%Goat/1% BSA/PBS
- 1°AK Pecam-1(CD31 monoklonal) 1:20 in 5.) über Nacht bei 4°C (mono mouse anti human CD31,clone: JC70A, DAKO)
- Waschen in PBS
- 1h mit 2° AK anti-mouse-AP 1:50 in 5.) (RT) (goat anti mouse-AP konj.,Sigma-AldrichChemie)
- Waschen mit A.d.
- 1h mit Fast Red färben (RT) (Fast Red TR/Naphthol As Mx Ta, Sigma-Aldrich Chemie)
- Waschen mit A.d.
- 1min Gegenfärben mit Hämalaun
- Waschen mit A.d. (keine Alkohol-Reihe)
- Eindeckeln mit Aquatex (Merck)

2.2.6.3 Protokoll vWF/Faktor VIII (DAKO®)

- Schnitte über Nacht bei 37°C oder 30 min bei 70°C trocknen (immer auf SuperFrost OT)
- Entparaffinieren: Xylol (5 min, 5 min, 5-45 min), absteigende Alkohol-Reihe (2x5min Propanol, 2x5 min 96% Ethanol, 5 min 70% Ethanol) → A.d. gründlich waschen
- Im Autoklav (Wasserbad) bei 96°C 30 min in TRS pH 9.0 erhitzen (Antigen-Demaskierung) → 30 min bei RT abkühlen (Target Retrieval Solution pH 9,0, Dako, REF S 2367)
- Waschen in A.d. → PBS
- 1h Blocken mit 10%Goat/1% BSA/PBS
- 1°AK vWF, 1:125 in 5.) über Nacht bei 4°C (vWF, Clone F8/86, DAKO)
- Waschen in PBS
- 1h mit 2° AK anti-mouse-AP 1:50 in 5.) (RT) (goat anti mouse-AP konj., Sigma-Aldrich Chemie)

- Waschen mit A.d.
- 1h mit Fast Red färben (RT) (Fast Red TR/Naphthol As Mx Ta, Sigma-Aldrich Chemie)
- Waschen mit A.d.
- 1min Gegenfärben mit Hämalan
- Waschen mit A.d. (keine Alkohol-Reihe!!!)
- Eindeckeln mit Aquatex (Merck)

2.2.6.4 Protokolle FGFRs und FGFs

Anfang für alle Austestungen

- Schnitte ü. N. bei 37°C oder 30 min bei 70°C trocknen (immer auf SuperFrost OT)
- Entparaffinieren: Xylol (5 min, 5 min, 5-45 min), absteigende Alkoholreihe (2x5 min Propanol, 2x5 min 96% Ethanol, 5 min 70% Ethanol)→ A.d. gründlich waschen
- Im Autoklav bei 120°C 5 min in Citratpuffer pH 6,0 kochen (Antigen-Demaskierung)→30 min bei RT abkühlen
- waschen in A.d.
- 10 min mit 3% H₂O₂ /A.d., Entfernen der endogenen Peroxidase
- waschen in A.d. → PBS
- 1h mit 10% Rabbit/1% BSA/PBS, blockieren der unspezifischen Bindungsstellen (bei RT) (7)

FGF-1

- ü. N. bei 4°C 1°AK FGF1 goat, (Verd.1:50)
- Waschen mit PBS
- 30 min mit 2°AK anti-goat-biotinyliert 1:100 in 7. (RT)
- Waschen mit PBS
- 30 min mit AB-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in PBS inkubieren (RT), 15 min vor Gebrauch ansetzen

FGF-2

- ü. N. bei 4°C 1°AK FGF-2 rabbit, (Verd. 1:50) in 7.
- Waschen mit PBS
- 30 min mit 2° Ak anti-rabbit-biotinyliert 1:100 in 7. (ABC-Kit) (RT)
- Waschen mit PBS
- 30 min mit AB-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in PBS inkubieren (RT), 15 min vor Gebrauch absetzen

FGFR1

- ü. N. bei 4°C 1°AK Flg rb, (Verd.1:50),
- Waschen mit PBS
- 30 min mit 2° Ak anti- mouse/rabbit-biotinyliert 1:100 (ABC-Kit)
- Waschen in PBS
- 30 min mit AB-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in PBS inkubieren (RT), 15 min vor Gebrauch ansetzen

FGFR3

- ü.N. bei 4° 1° AK FGFR-3 (Verd. 1:50) in 7.
- Waschen mit PBS
- 30 min mit 2° AK anti rb/ms-biotinyliert (ABC-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in 7.) (RT)
- Waschen mit PBS
- 30 min mit AB-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in PBS inkubieren (RT), 15 min vor Gebrauch ansetzen

FGFR4

- ü. N. bei 4°C 1°AK FGFR-4rb (Verd. 1:50 in 7.)
- Waschen mit PBS
- 30 min mit 2° AK anti rb/ms-biotinyliert (ABC-Komplex (ABC-Kit) 1:100 in 7.) (RT)
- Waschen mit PBS
- 30 min mit AB-Komplex (ABC-Kit) in 1:100 in PBS inkubieren (RT), 15 min vor Gebrauch ansetzen!

ICAM-1

- ü. N. bei 4°C 1° AK CD54 (ms monoklonal) 1:100
- Waschen in PBS
- 1 h mit 2° AK goat-anti-mouse-AP 1:50 bei RT
- Waschen in PBS

Ende für alle Austestungen

- Waschen mit PBS
- 5 min mit DAB (RT) färben (1:50)
- Waschen mit A.d.
- 30 sec mit Hämalun gegenfärben
- aufsteigende Alk.-Reihe→Xylol
- Eindeckeln mit Entellan

2.2.7 Morphometrie des Gefässsystems

Zur Quantifizierung der Tumorangiogenese wurden in den Gewebeschnitten zunächst die am stärksten vaskularisierten Tumoreale identifiziert. Diese sogenannten „Hot spots“ wurden anfangs bei niedriger Vergrößerungsstufe unter dem Mikroskop markiert. Hierbei wurde nach dem Protokoll von Weidner et al. 1991, 1993 verfahren. Mithilfe des Mikroskops (Zeiss Axiophot) unter Einsatz eines digitalen Bildbearbeitungsprogramms (Axiovision Zeiss AG, Göttingen) wurden die markierten Areale in der 200-fachen Vergrößerung aufgenommen. Je Tumor wurden 3 bis 5 Areale ohne Kenntnis klinischer oder prognostischer Parameter für die weitere Auswertung aufgenommen und quantitativ ausgewertet. Als Mikrogefäß wurden diejenigen Strukturen gewertet, die sich durch eine rote Anfärbung klar von anderen Mikrogefäßen, Tumorzellen oder Bindegewebe unterscheiden haben. Neben der Gefäßanzahl (micro vessel density, MVD) wurde auch die Gesamtfläche der Gefäße (vascular surface area, VSA), manuell unter Verwendung eines transparenten Gitternetzes, bestehend aus 3400 gleich grossen Quadraten (Fläche DIN A4) mit einer Kantenlänge von 4 mm, bestimmt. Auf Ausdrucken der digitalisierten Bilder der CD31- sowie der Faktor VIII Färbung wurde das Gitternetz platziert und die Flächenauswertung vorgenommen. Dabei wurde jedes Quadrat, in dessen linker oberer Ecke ein Gefäß angeschnitten wurde, als Ereignis gewertet. Die Summe der Quadrate wurde in Relation zur Gesamtsumme von 3400 Quadraten in Prozent ausgedrückt. Von den jeweiligen Werten wurden die Mittelwerte gebildet. Für die Untersuchung fanden ausschließlich Tumorpräparate guter Farbqualität mit fehlender bzw. geringer Hintergrundfärbung Verwendung. Bei Untersuchung der Urothelkarzinome konnte in jeweils einem Fall keine auswertbare CD 31 Färbung oder auswertbare Faktor VIII Färbung erzielt werden. Die so ermittelten Werte für MVD und VSA wurden anschliessend in eine EXCEL-Tabelle übertragen.

Bildtafel Immunhistochemie der Gefäßmarkierung

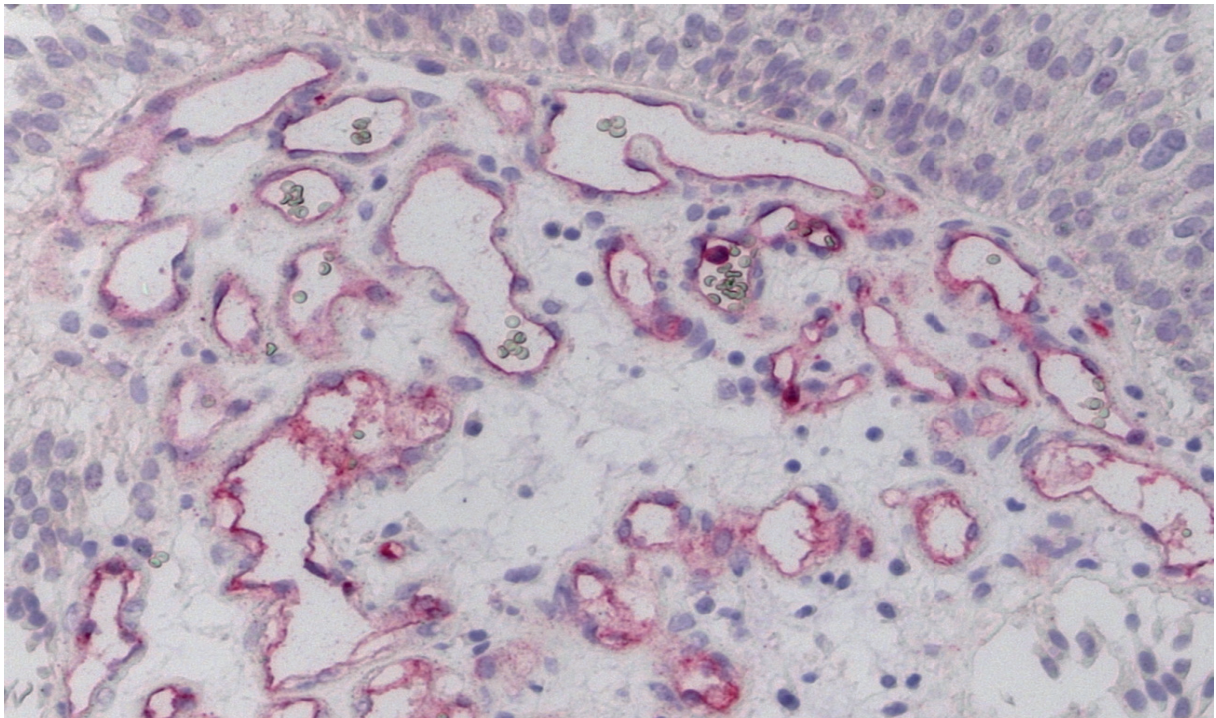


Abb. 18: Immunhistochemie mit CD31

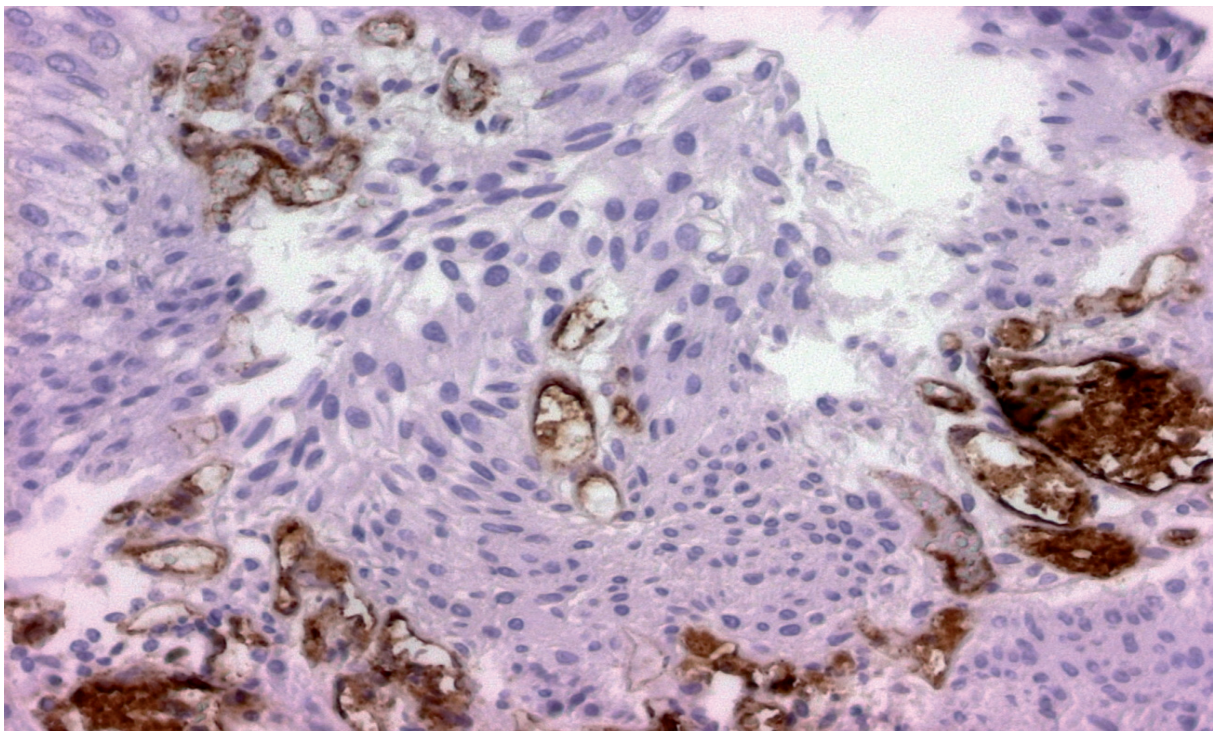


Abb. 19: Immunhistochemie mit Faktor VIII

2.2.8 Datendokumentation und Auswertung am Computer

2.2.8.1 Fotodokumentation

Die Fotodokumentation der Bilder sämtlicher immunhistochemischen Färbungen erfolgte mithilfe des Mikroskops (Zeiss Axiophot) unter Einsatz eines digitalen Bildbearbeitungsprogramms (Axiovision Zeiss AG, Göttingen).

2.2.8.2 Auswertung und Dokumentation der Daten

Für die EDV-technische Dokumentation und Auswertung der Datensätze wurde die Software Excel 2004 von Microsoft® verwendet. Mithilfe dieses Programms wurden sämtliche ermittelten Werte zwischengespeichert, bevor sie endgültig nach Vervollständigung des Datensatzes mit dem Follow-up und der teilweise noch nötigen Umwandlung in dichotome Datensätze zusammen mit anderen Markern für die statistische Analyse in das Statistikprogramm SPSS 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) übertragen wurden.

2.2.8.3 Statistische Analysen

Die statistischen Analysen wurden mit dem Statistical Package Version 16.0 (SPSS Inc., Chicago, IL, USA) durchgeführt. Als statistisch signifikant galten dabei Unterschiede ab einem Wert von $p < 0,05$. Bei einfachen multiplen Testprozeduren wurden die p-Werte mit der Bonferroni-Holm-Methode (Ludbrook, 1998) berichtigt (Angleichung für multiple Vergleiche). Um Assoziationen zwischen gemessenen Parametern zu errechnen, wurden der χ^2 -Test und der zweiseitige Fisher-exakt-Test durchgeführt. Um die verschiedenen Variablen in Bezug auf das rezidivfreie Überleben und das Gesamtüberleben zu vergleichen wurde die Kaplan-Meier-Produkt-Limit-Methode (Kaplan et Meier, 1958) angewandt. Die dazugehörigen Signifikanzen wurden durch eine zweiseitige Log-Rang-Statistik evaluiert. Für die Analyse des Gesamtüberlebens wurde als Bezugsgrösse das Todesdatum oder das letzte als lebend gemeldete Datum des Tumorzentrums Regensburg gewählt, Ausgangspunkt war der Diagnosemonat.

Für die statistische Erfassung wurden die Daten wie folgt verschlüsselt:

Parameter	Dichotome Umwandlung (Eigenschaft = dichotomer Wert)		
Tumorstadium	pTa = 1	pT1 = 2	pT2 = 3
Grading	G1 =1	G2 =2	G3 =3
Geschlecht	Männlich = 0		Weiblich = 1
Alter bei Erstdiagnose	< 71 = 0		≥ 71 = 1
FGFR3-Mutation	Wildtyp = 1		Mutant = 2
CD31 MVC	< 16,5 = 0		≥ 16,6 = 1
CD31 VSA	< 13,99 = 0		≥ 14,00 = 1
Faktor VIII MVC	< 16,7 = 0		≥ 16,8 = 1
Faktor VIII VSA	< 13,79 = 0		≥ 13,79 = 1
Expression FGFR1	Negativ = 0		Positiv = 1
Expression FGFR2	Negativ = 0		Positiv = 1
Expression FGFR3	Negativ = 0		Positiv = 1
Expression FGFR4	Negativ = 0		Positiv = 1
Expression FGF-1	Negativ = 0		Positiv = 1
Expression FGF-2	Negativ = 0		Positiv = 1
Expression ICAM-1	Negativ = 0		Positiv = 1
Rezidivfreies Überleben	Kein Rezidiv = 0		Rezidiv = 1
Gesamtüberleben (Abfrage 2007/2008)	Lebt = 1		Tod = 0

Tab. 3: Verschlüsselung der Daten zur weiteren Verarbeitung

3 Ergebnisse

3.1 Patientenkollektiv

Fall	Geschlecht	Alter bei Diagnose	FGFR3-Mutation	Tumor-stadium	Grading	Rezidiv	Gesamt-überleben
1	weiblich	87	Wildtyp	pTa	G2	Nein	Nein
2	männlich	74	Mutant	pTa	G2	Ja	Nein
3	männlich	68	Wildtyp	pTa	G1	Nein	Ja
4	weiblich	74	Wildtyp	pTa	G2	Nein	Ja
5	weiblich	86	Mutant	pT1	G2	Ja	Nein
6	männlich	74	Wildtyp	pT2	G3	Nein	Nein
7	weiblich	58	Wildtyp	pTa	G1	Ja	Ja
8	männlich	78	Wildtyp	pT1	G2	Nein	Nein
9	männlich	69	Wildtyp	pT1	G3	Nein	Ja
10	weiblich	83	Wildtyp	pTa	G1	Nein	Ja
11	männlich	61	Wildtyp	pT1	G3	Ja	Nein
12	weiblich	71	Mutant	pT1	G3	Ja	Ja
13	männlich	61	Wildtyp	pTa	G2	Ja	Ja
14	männlich	71	Mutant	pTa	G1	Ja	Ja
15	weiblich	70	Wildtyp	pT1	G3	Nein	Ja
16	männlich	59	Mutant	pTa	G2	Nein	Ja
17	männlich	65	Mutant	pTa	G2	Ja	Nein
18	männlich	73	Mutant	pTa	G2	Nein	Nein
19	männlich	71	Mutant	pTa	G2	Nein	Nein
20	männlich	71	Wildtyp	pTa	G1	Nein	Ja
21	männlich	84	Mutant	pTa	G2	Ja	Ja
22	männlich	65	Mutant	pTa	G2	Ja	Ja
23	männlich	79	Mutant	pTa	G2	Ja	Nein
24	männlich	69	Wildtyp	pTa	G2	Nein	Ja
25	männlich	76	Wildtyp	pT1	G3	Nein	Nein
26	männlich	75	Wildtyp	pT1	G2	Ja	Nein
27	männlich	70	Mutant	pTa	G1	Ja	Ja
28	männlich	79	Mutant	pTa	G1	Ja	Ja
29	weiblich	70	Wildtyp	pTa	G1	Ja	Ja
30	männlich	57	Mutant	pTa	G2	Nein	Ja
31	mannlich	61	Mutant	pTa	G1	Nein	Ja
32	männlich	67	Wildtyp	pTa	G2	Ja	Nein
33	weiblich	72	Mutant	pTa	G1	Nein	Nein
34	weiblich	73	Mutant	pTa	G2	Nein	Ja
35	männlich	76	Mutant	pTa	G2	Nein	Nein
36	männlich	74	Wildtyp	pTa	G1	Nein	Ja
37	männlich	70	Mutant	pTa	G2	Nein	Ja

38	männlich	74	Wildtyp	pT1	G3	Nein	Nein
39	männlich	62	Wildtyp	pTa	G3	Nein	Ja
40	männlich	65	Wildtyp	pTa	G2	Nein	Nein
41	männlich	86	Wildtyp	pT2	G3	Nein	Nein
42	männlich	77	Wildtyp	pT1	G2	Nein	Nein
43	männlich	94	Wildtyp	pT1	G2	Ja	Nein
44	männlich	68	Mutant	pTa	G1	Nein	Nein
45	männlich	58	Wildtyp	pT1	G2	Nein	Nein
46	männlich	41	Mutant	pTa	G1	Nein	Ja
47	männlich	76	Mutant	pT2	G2	Nein	Nein
48	männlich	50	Wildtyp	pT1	G2	Nein	Ja
49	weiblich	81	Mutant	pT1	G3	Nein	Nein
50	männlich	79	Wildtyp	pT1	G1	Nein	Nein
51	männlich	65	Mutant	pT2	G3	Ja	Nein
52	männlich	56	Wildtyp	pTa	G1	Nein	Ja
53	männlich	63	Mutant	pTa	G1	Ja	Ja
54	männlich	64	Wildtyp	pT1	G2	Nein	Ja
55	männlich	56	Wildtyp	pTa	G1	Nein	Nein
56	männlich	50	Mutant	pTa	G1	Ja	Ja
57	männlich	83	Wildtyp	pT2	G3	Nein	Ja
58	männlich	74	Mutant	pTa	G2	Nein	Ja
59	männlich	77	Wildtyp	pTa	G2	Nein	Ja
60	weiblich	81	Wildtyp	pT1	G3	Nein	Ja
61	weiblich	75	Mutant	pTa	G2	Nein	Ja

Tab. 4: Abbildung der histopathologischen Daten des Patientenkollektivs

3.2 FGFR3-Mutationsstatus und klinische/klassische histopathologische Daten

Das Patientenkollektiv (siehe Tabelle 1) umfasste 13 weibliche und 48 männliche Patienten. 27 Patienten waren zum Diagnosezeitpunkt jünger und 34 älter als 71 Jahre (mittleres Lebensalter 66 ± 25 ; Median 70,7 Jahre). Die Geschlechterverteilung ergab 78,7% männliche zu 21,3% weibliche Patienten.

Variable	Kategorisierung	Patienten	
		N	%
FGFR3-Mutation	Wildtyp	33	54,1
	Mutant	28	45,9
	Gesamt	61	100,00

Tab. 5: Verteilung der Ergebnisse der FGFR3-Mutationsanalyse

Die Bestimmung des FGFR3-Mutationsstatus ist in der vorherigen Tabelle abgebildet. Die Mehrheit der mutierten Patienten litt an einem nicht invasiven papillären Urothelkarzinom (pTa). Insgesamt lag bei den mutierten Patienten in 23 Fällen ein pTa-, in 3 Fällen ein pT1- und in 2 Fällen ein pT2-Tumorstadium vor, bei insgesamt 39 Patienten mit nicht invasivem pTa-, 16 Patienten mit invasivem pT1- bzw. 6 Patienten mit pT2-Tumorstadium. Die Verteilung nach Differenzierungsgrad zeigte in 18 Fällen einen gut- (G1), in 29 einen mittelgradig- (G2) und in 14 Fällen einen schlecht differenzierten Tumor (G3). In Bezug auf den Mutationsstatus der Patienten zeigte sich eine Tendenz der Mutanten hin zu gut- bis mittelgradig differenzierten (9 Mutanten mit G1, 16 Mutanten mit G2), bei nur 3 schlecht differenzierten Tumoren (G3).

Der Nachbeobachtungszeitraum der Patienten erstreckte sich über 16 - 132 Monate mit einem Median von 74 Monaten. 20 Patienten erlitten in dieser Zeit ein oder mehrere Rezidive, wobei es in 13 Fällen zu einem, in 4 Fällen zu jeweils 2, in einem Fall zu 3 und in zwei Fälle zu jeweils 4 Rezidiven kam. 41 Patienten blieben rezidivfrei. 9 Patienten verstarben nach mindestens einem Rezidiv, von denen 5 mutiert und 4 Wildtyp waren, 19 Patienten verstarben rezidivfrei. Während der Nachbeobachtung verstarben insgesamt 28 Patienten, in 7 Fällen war der Tod tumorbedingt. Am Ende des Beobachtungszeitraums lebten noch 33 der Tumorkranken. Von den tumorbedingt Verstorbenen waren 3 Patienten positiv auf eine FGFR3-Mutation getestet worden. Insgesamt lebten 42 Patienten nach Erstdiagnose länger als 5 Jahre, 19 Patienten verstarben vorher.

Die Korrelation klinischer und histopathologischer Parameter mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben zeigte zu erwartende Ergebnisse. Der in Abb. 20 untersuchte Zusammenhang zwischen Alter bei Erstdiagnose und Gesamtüberleben war statistisch signifikant unterschiedlich (**p=0.020**) zwischen den Gruppen A (< 71Jahre) und B (≥ 71Jahre). Nach 100 Monaten (8,3 Jahre) waren von Gruppe A noch 75%, von Gruppe B nur noch 35% der

Patienten am Leben. Da tumorbedingt nur wenige Patienten verstarben, lässt sich dies durch eine steigende Morbidität mit konsekutiver Mortalität erklären. Die Korrelation mit rezidivfreiem Überleben erbrachte keinen signifikanten Unterschied. Ebenfalls ohne signifikanten Unterschied blieb der Vergleich Geschlecht/Gesamtüberleben und Geschlecht/rezidivfreies Überleben bei männlichen und weiblichen Patienten.

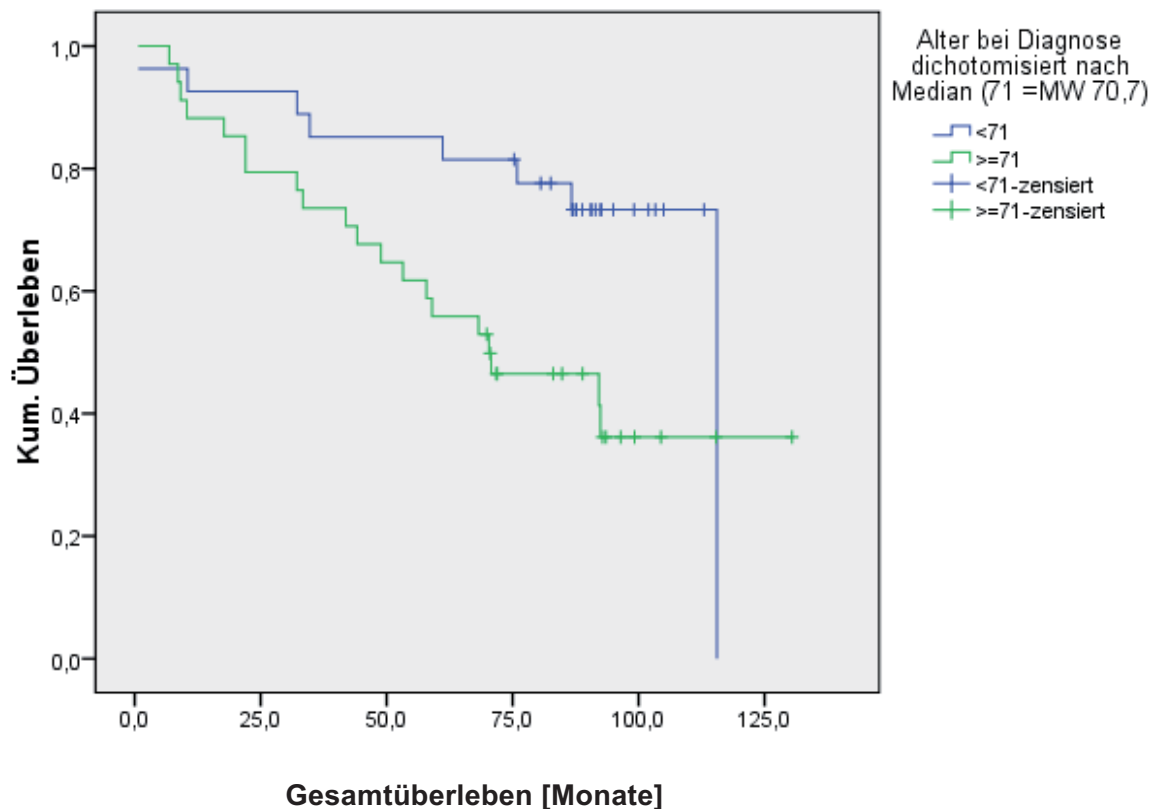


Abb. 20: Zusammenhang zwischen Alter bei Erstdiagnose und Gesamtüberleben.

Die Korrelation Tumorstadium/Gesamtüberleben und Tumor - Differenzierungsgrad/ Gesamtüberleben wird in den Abb. 21 und 22 verdeutlicht. Wie zu erwarten überlebten Patienten mit oberflächlichen papillären nicht invasiven Tumoren (Gruppe A = pTa) signifikant länger als Patienten mit invasiven Urothelkarzinomen (pT1 = Gruppe B, pT2 = Gruppe C). Nach 80 Monaten lebten von Gruppe A noch 70% und von Gruppe B und C nur noch 40% oder weniger (**p=0.002**). Ebenfalls überlebten Patienten mit gut differenzierten Tumoren signifikant länger (**p=0.031**) als Patienten mit G2- oder G3-Tumoren. Nach 100 Monaten (8,3 Jahre) waren noch über 80% der Patienten mit G1-Tumoren am Leben, Patienten mit G2- und G3-Tumoren nur noch zu 40%. Kein statistisch signifikanter

Unterschied ergab sich bei der Korrelation rezidivfreies Überleben mit Tumorstadium oder Differenzierungsgrad.

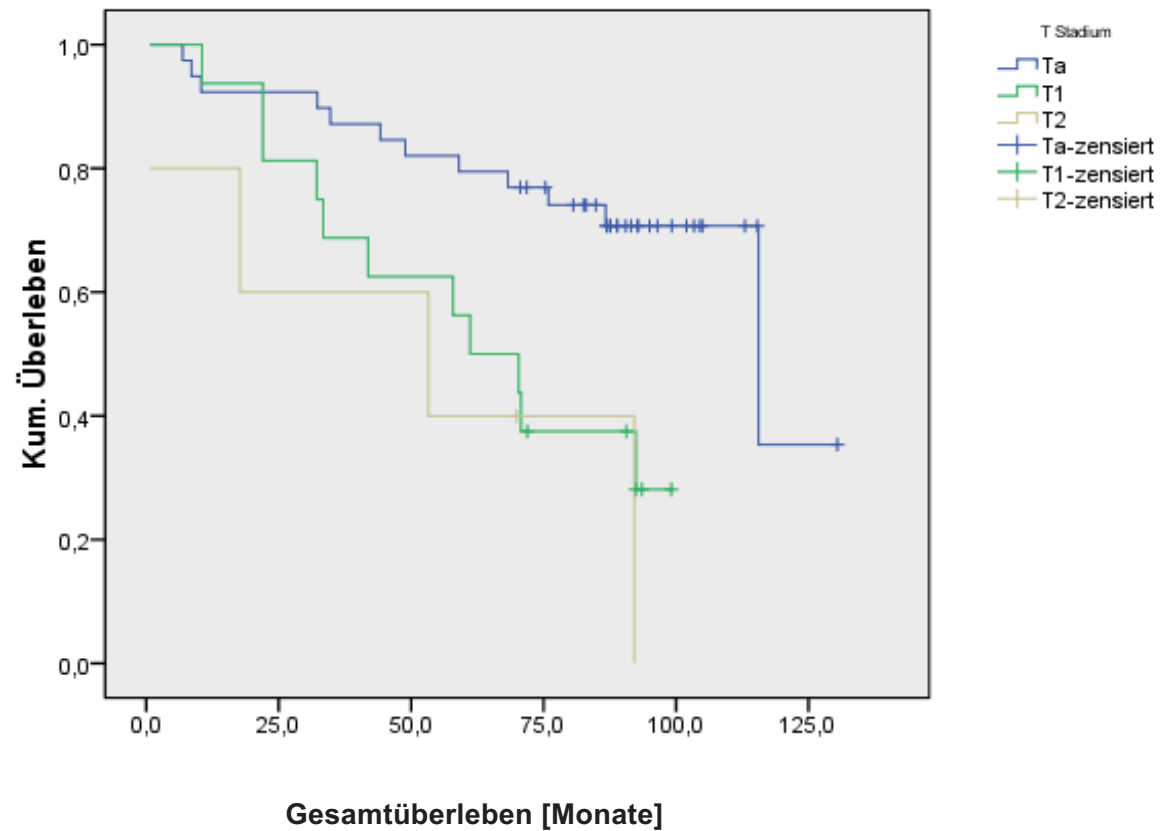


Abb. 21: Korrelation T-Stadium/Gesamtüberleben.

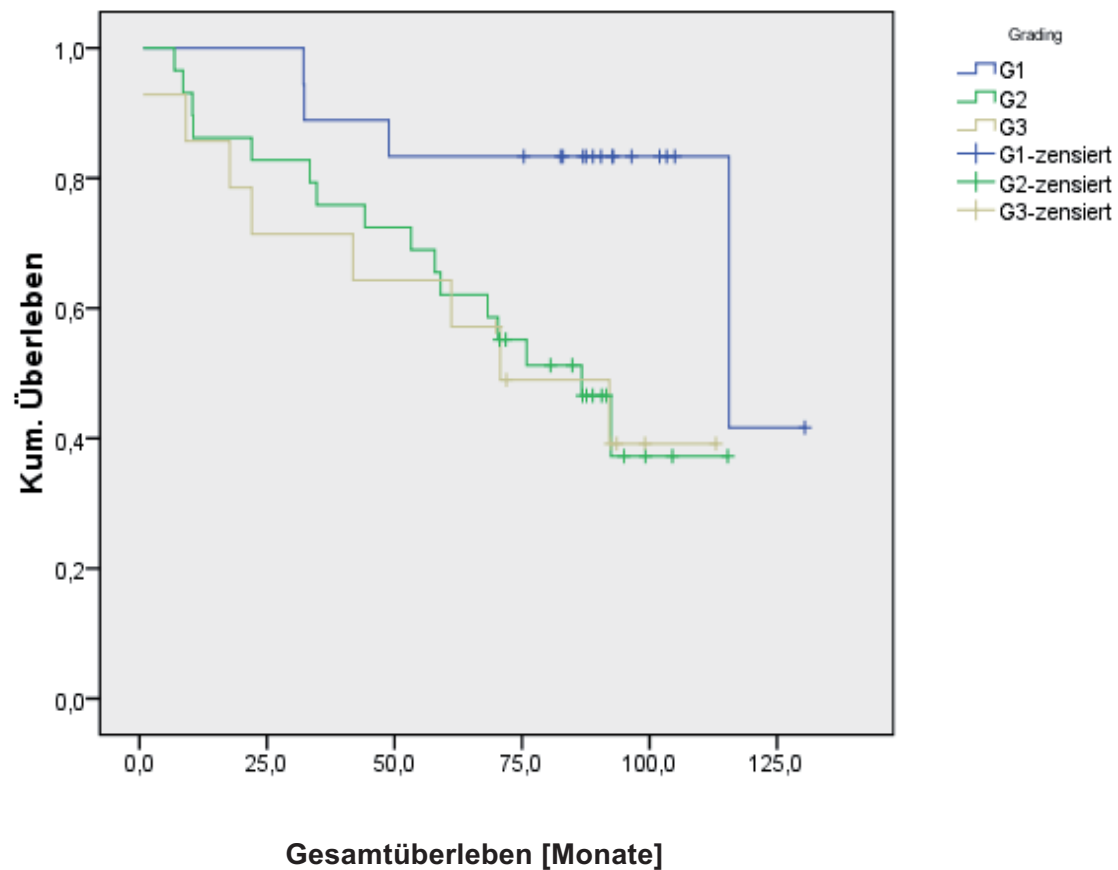


Abb. 22: Korrelation Tumordifferenzierungsgrad und Gesamtüberleben.

Bei Korrelation des FGFR3-Mutationsstatus mit Gesamt- bzw. rezidivfreiem Überleben (Abb. 23) konnte kein statistisch signifikanter Unterschied zwischen mutierten und Wildtyp Patienten gefunden werden. Nach 100 Monaten (8,3 Jahre) lebten noch ca. 58% der mutierten Patienten, bei fehlender Mutation dagegen noch 50% ($p=0.960$).

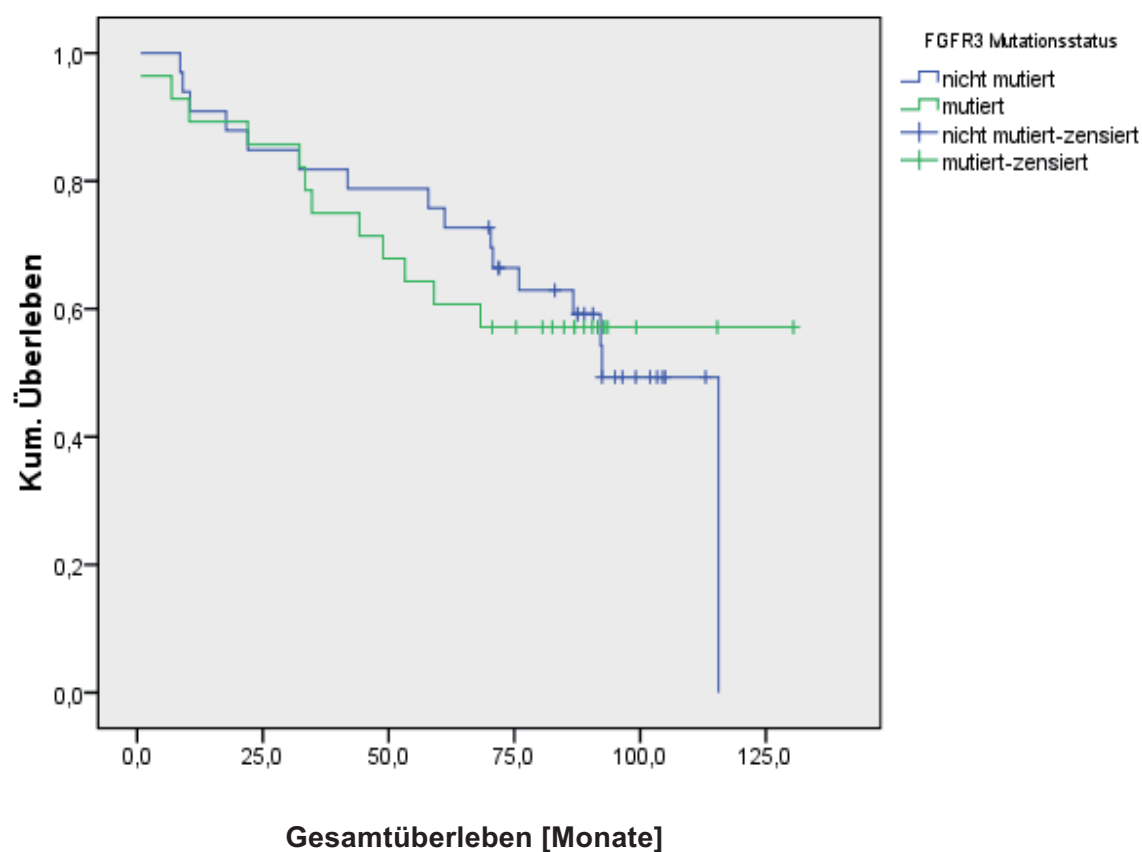


Abb. 23: Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationsstatus und Gesamtüberleben der Patienten

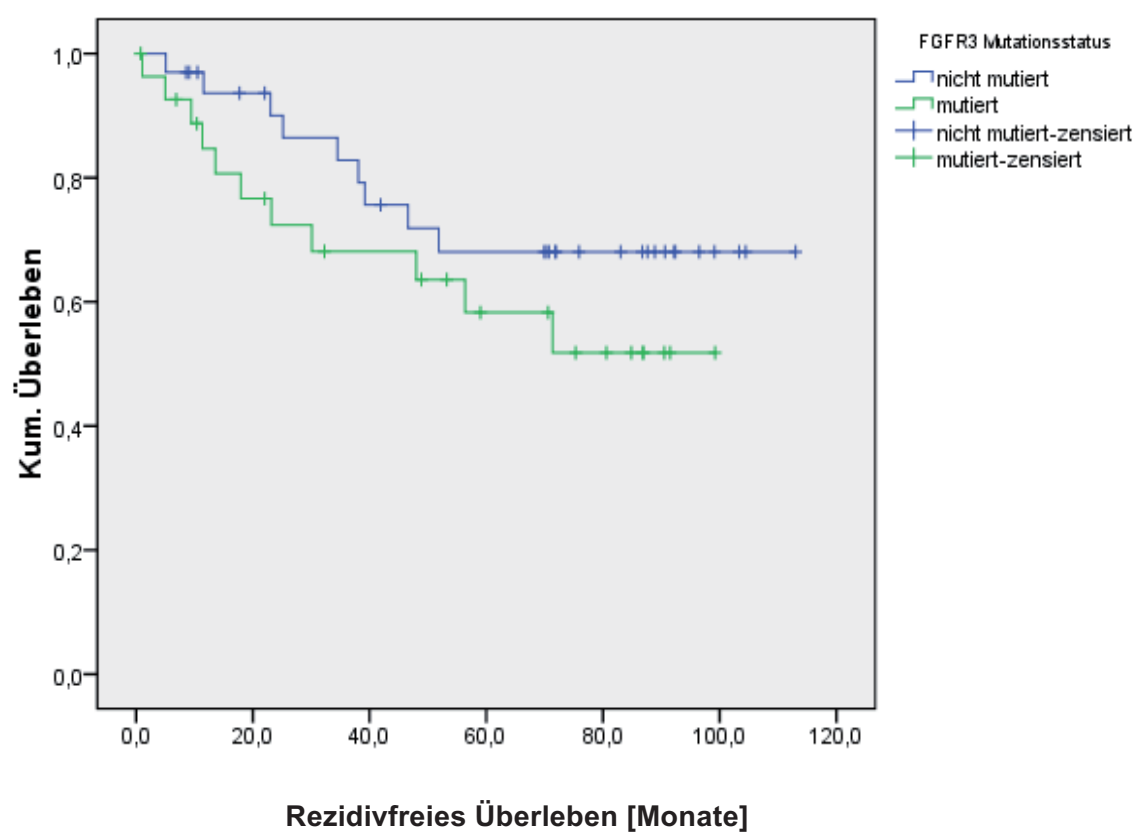


Abb. 24: Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationsstatus und Rezidivrate

3.3 Tumorangiogenese

3.3.1 Ergebnistabelle

Patient	Faktor VIII MVC	Faktor VIII VSA	CD31 MVC	CD31 VSA
1	14,8	16,93	12,2	5,99
2	18,0	10,99		
3	19,8	11,09	8,2	15,65
4	35,2	11,36	13,4	13,96
5	21,2	14,63	16,1	13,94
6	22,0	13,49	53,8	16,54
7	6,6	16,37	9,2	22,04
8	11,0	17,44	10,4	19,22
9	21,2	16,82	17,9	19,01
10	8,8	21,52	11,8	6,91
11	9,3	7,6	14,8	8,32
12	18,8	14,54	12,2	12,19
13	19,8	11,14	20,8	10,88
14	10,4	20,28	14,0	19,75
15	22,6	10,62	24,2	12,63
16	26,6	20,73	14,3	10,11
17	18,2	9,83	22,0	16,33
18	7,2	11,59	7,4	12,03
19	17,2	11,31	13,2	11,13
20	16,8	13,85	10,8	10,42
21	3,8	21,55	11,2	5,32
22	12,8	18,36	15,2	10,56
23	21,0	11,89	23,2	17,67
24	22,4	10,13	19,4	14,69
25	19,6	15,15	19,8	12,85
26	6,2	9,43	20,6	19,25
27	8,3	9,22	15,4	14,12
28	11,6	6,76	22,7	10,29
29	19,0	9,3	15,4	10,04
30	8,3	9,66	17,0	14,5
31	10,0	16,15	30,4	13,82
32	8,4	10,66	12,4	10,74
33	26,6	27,10	24,2	28,87
34	7,2	30,49	13,2	25,93
35	21,9	23,07	21,8	20,28
36	12,0	9,45	14,5	15,64
37	8,2	19,97	10,3	19,76
38	26,5	11,84	24,1	11,35

39	16,4	12,22	19,8	16,35
40	25,0	20,18	28,2	15,23
41			19,5	8,92
42	12,0	13,84	19,5	23,88
43	26,8	10,12	26,4	11,97
44	29,2	14,43	24,0	22,71
45	6,0	7,46	9,0	2,32
46	18,0	13,57	13,0	12,41
47	14,4	15,47	27,7	20,3
48	24,3	10,35	16,0	17,28
49	16,8	20,56	25,0	20,13
50	10,6	8,22	18,6	8,73
51	30,6	25,95	40,8	11,27
52	18,0	17,65	24,0	12,85
53	20,8	20,27	19,4	19,98
54	13,8	5,16	12,8	9,86
55	11,5	11,55	8,1	10,01
56	10,2	24,51	9,5	16,74
57	15,3	6,84	13,2	10,02
58	13,7	21,62	10,5	31,02
59	22,0	10,01	19,3	19,93
60	21,3	17,09	17,3	9,71
61	13,4	20,84	14,7	19,39

Tab. 6: Ergebnistabelle Tumorangiogenese

Die Tumorangiogenese wurde durch die Parameter Mikrogefäßsdichte MVC (microvessel count) und VSA (vascular surface area) erfasst. Die Beschreibung der Auswertung ist in Kapitel 2.2.7 beschrieben. Nach Ermittlung von MVC und VSA für Faktor VIII bzw. CD 31 wurden die jeweiligen Werte mittels Median dichotomisiert. Für Faktor VIII lag der Median für MVC bei 16,8. 29 Fälle lagen unter und 31 Fälle über diesem Wert. In einem Fall konnte der MVC nicht bestimmt werden, dieser Fall wurde nicht in die Auswertung einbezogen. Für VSA von Faktor VIII wurde ein Median von 13,8 bestimmt. Hier lagen 29 Fälle unter und 31 Fälle über dem Wert. In einem Fall konnte kein VSA-Wert bestimmt werden. Bei CD 31 lag der Median für MVC bei 16,6, wobei sich jeweils 30 Fälle über und unter diesem Wert befanden. Ein Fall konnte nicht einbezogen werden. Der Median für VSA ergab 14. 31 Fälle lagen unter und 29 über diesem Wert und auch hier konnte in einem Fall keine verlässliche Bestimmung gemacht werden.

3.3.2 Korrelationsanalyse MVC, VSA Werte der Gefäßmarker Faktor VIII und CD 31

		CD 31 dichotom	Faktor VIII	CD 31 dichotom	Faktor VIII
		MVC / MVC		VSA / VSA	
CD 31	CC		0.564		0.344
	<i>p</i>		< 0.0001		0.008
	N		59		59
Faktor VIII dichotom	CC	0.424		0.12	
	<i>p</i>	0.001		0.367	
	N	59		59	

Tab. 7: MVC = microvessel count, VSA = vascular surface area, CC = Korrelationsquotient, Signifikante p-Werte sind fettgedruckt (Spearman's rho Test).

Die obige Tabelle zeigt, dass fast alle der gemessenen Werte der beiden Gefäßmarker Faktor VIII und CD 31 statistisch signifikant korrelieren.

3.3.3 Korrelationsanalyse der Gefäßmarker Faktor VIII und CD 31 mit klassischen histopathologischen Parametern

		Faktor VIII		CD 31	
		MVC	VSA	MVC	VSA
Alter bei Diagnose	CC	0.003	0.131	0.034	0.064
	<i>p</i>	0.980	0.319	0.799	0.629
	N	60	60	60	60
Tumorstadium	CC	0.120	0.012	0.272	0.159
	<i>p</i>	0.366	0.928	0.037	0.228
	N	59	59	59	59
Grading	CC	0.257	0.022	0.270	0.135
	<i>p</i>	0.048	0.868	0.037	0.303
	N	60	60	60	60
Mutations status	CC	0.031	0.303	0.101	0.198
	<i>p</i>	0.813	0.019	0.445	0.130
	N	60	60	60	60

Tab. 10: MVC = microvessel count, VSA = vascular surface area, CC = Korrelationsquotient, Signifikante p-Werte sind fett gedruckt. (Spearman's rho test)

Die Korrelation Tumorstadium und MVC-Wert des Gefäßmarkers CD 31 zeigte statistisch signifikant weniger Gefäße (**p=0.037**) bei Patienten mit oberflächlichen, papillären nicht invasiven Urothelkarzinomen als bei Patienten mit invasiven Tumoren. Ähnliche Ergebnisse ergab die Korrelation Tumordifferenzierungsgrad und MVC von Faktor VIII und CD31. Bei Patienten mit gut differenzierten Urothelkarzinomen wurden mittels beider Gefäßmarker

statistisch signifikant weniger Gefäße erfasst (**Faktor VIII MVC: $p=0,048$; CD31 MVC: $p=0,037$**) als bei Patienten mit schlechter differenzierten Tumoren. Die Korrelation VSA beider Gefäßmarker mit Tumorstadium und Differenzierungsgrad erbrachte keine signifikanten Ergebnisse, ebenso wenig die Korrelation mit dem Diagnosealter der Patienten.

Bei Korrelation von FGFR3-Mutationsstatus mit dem VSA-Wert des Gefäßmarkers Faktor VIII wurde deutlich, dass bei mutierten Patienten statistisch signifikant höhere Werte für VSA ermittelt wurden als bei Patienten mit fehlender Mutation (**$p=0,019$**). Für den VSA von Faktor VIII und den MVC beider Gefäßmarker konnte kein statistisch signifikanter Unterschied ermittelt werden.

3.3.4 Tumorangiogenese und Überlebensfunktionen

			Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
			Gruppe A	Gruppe B	p	Gruppe A	Gruppe B	p
CD 31	MVC	Zeit	76.98±7.26	82.42±8.3		93.73±7.5	77.74±8.41	
		N	30	30		30	30	
		Ereignis	10	9	p=0.953	9	18	p= 0.037
	VSA	Zeit	67.7±7.81	90.85±7.35		80.12±9.3	87.82±5.77	
		N	31	29		31	29	
		Ereignis	12	7	P=0.079	15	12	p=0.539
Faktor VIII	MVC	Zeit	76.72±7.9	79.08±7.68		95.7±8.14	71.89±6.57	
		N	29	31		11	16	
		Ereignis	12	8	p=0.441	29	31	p=0.161
	VSA	Zeit	75.67±8.75	76.04±6.5		86.64±8.4	84.11±7.2	
		N	29	31		29	31	
		Ereignis	11	9	p=0.477	14	13	p=0.83

Tab. 8: Zeit = Mediane Überlebenszeit in Monaten, MVC = microvessel count, VSA = vascular surface area, Signifikante p-Werte sind fettgedruckt. Als Cut-off-Wert für die Dichotomisierung galt der Median.

Die obige Tabelle stellt die Überlebenskurven anhand der beiden prognostischen MVC und VSA-Gruppen dar. Als Cut-off-Wert für die Dichotomisierung galt der Median: CD 31: MVC (Gruppe A: < 16.6, Gruppe B: ≥ 16.6), VSA (Gruppe A: < 14, Gruppe B: ≥ 14). Factor VIII: MVC (Gruppe A: < 16.8, Gruppe B: ≥ 16.8), VSA (Gruppe A: < 13.8, Gruppe B: ≥ 13.8). Die Patienten wurden nach den ermittelten Cut-off Werten in Gruppen unterteilt und diese mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben korreliert.

Für den MVC-Wert von Faktor VIII wurde in Gruppe A ($MVC < 16,7$) und Gruppe B ($MVC \geq 16,8$) unterteilt. Zwischen den beiden Gruppen konnte kein signifikanter Unterschied in Bezug auf das Gesamtüberleben festgestellt werden, jedoch war eine leichte Tendenz der Gruppe A hin zu längerem Überleben zu beobachten. Für den VSA von Faktor VIII wurden die Patienten in Gruppe A ($VSA < 13,79$) und Gruppe B ($VSA \geq 13,8$) aufgeteilt. Ein signifikanter Unterschied zwischen beiden Gruppen konnte nicht festgestellt werden, es konnte ein eher ähnlicher Verlauf der Überlebenskurven beobachtet werden. Dies galt auch für die Korrelation MVC bzw. VSA mit rezidivfreiem Überleben.

Der Gefäßmarker CD 31 ergab für MVC Gruppe A ($MVC < 16,5$) und Gruppe B ($MVC \geq 16,6$). Bei Korrelation mit dem Gesamtüberleben der Patienten wurde deutlich, dass Patienten mit niedrigerem MVC statistisch signifikant länger überlebten als Patienten mit höherem MVC ($p=0.037$). Nach 100 Monaten waren von Gruppe A mehr als 70% der Patienten, aus Gruppe B weniger als 40% der Patienten am Leben (Abb. 27). Für VSA konnte ein solches Ergebnis nicht festgestellt werden. Dort wurde in Gruppe A ($VSA < 13,99$) und B ($VSA \geq 14,0$) unterteilt. Ein deutlicher Unterschied ergab sich nicht, wobei erstaunlicherweise bis zum 75 Überlebensmonat bei Gruppe B ein prozentual höheres Gesamtüberleben zu beobachten war (Abb. 28). Ähnliches zeigte die Korrelation mit rezidivfreiem Überleben. Gruppe B überlebte tendenziell länger rezidivfrei als Gruppe A.

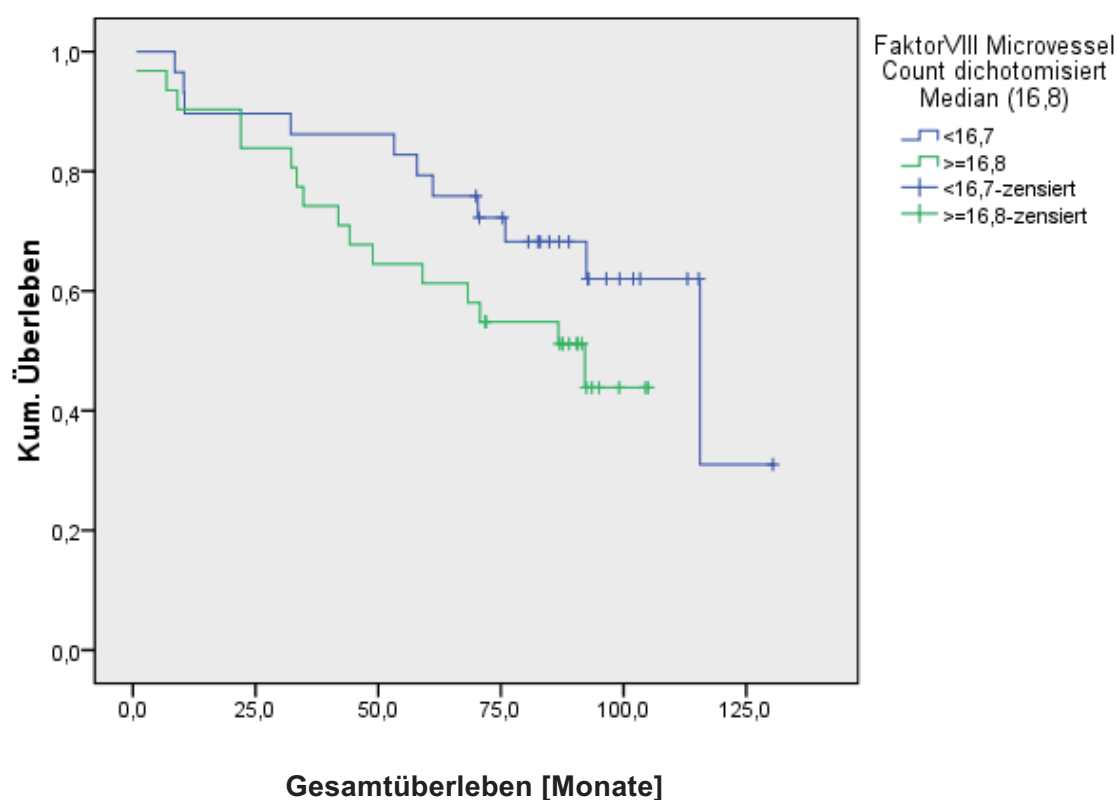


Abb. 25: Korrelation zwischen Faktor VIII MVC und Gesamtüberleben.

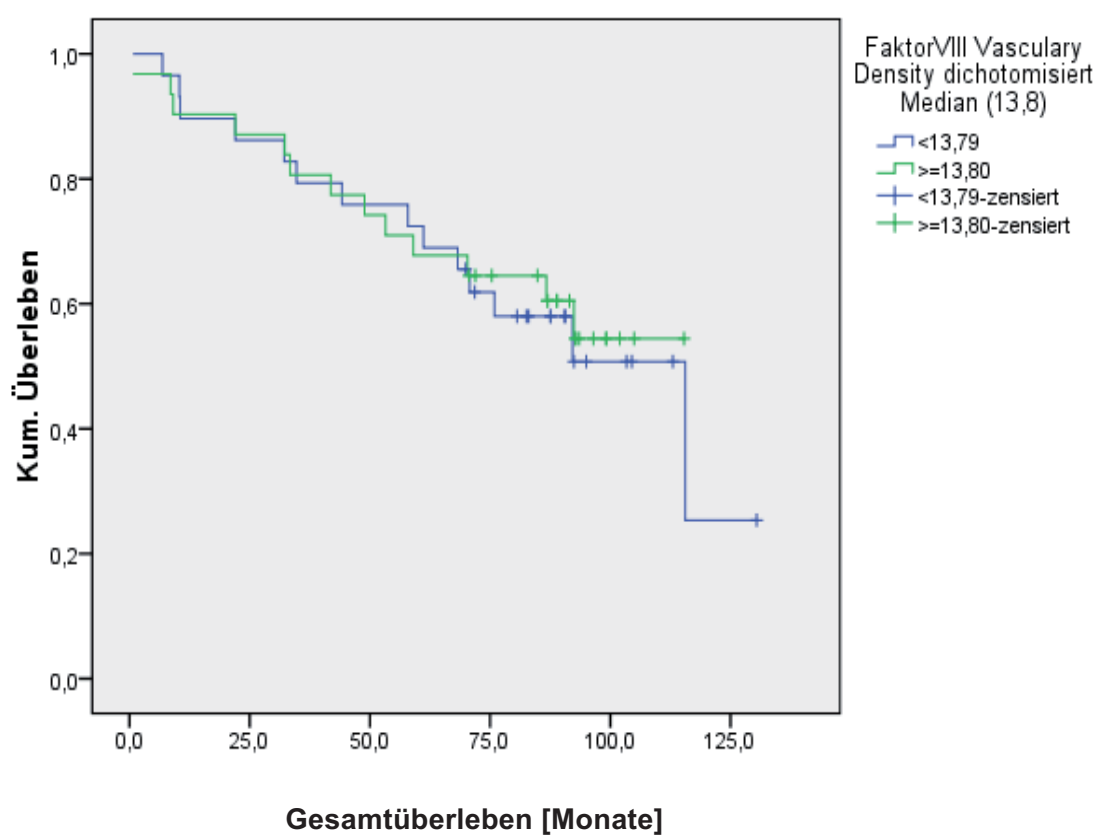


Abb. 26: Korrelation zwischen Faktor VIII VSA und Gesamtüberleben.

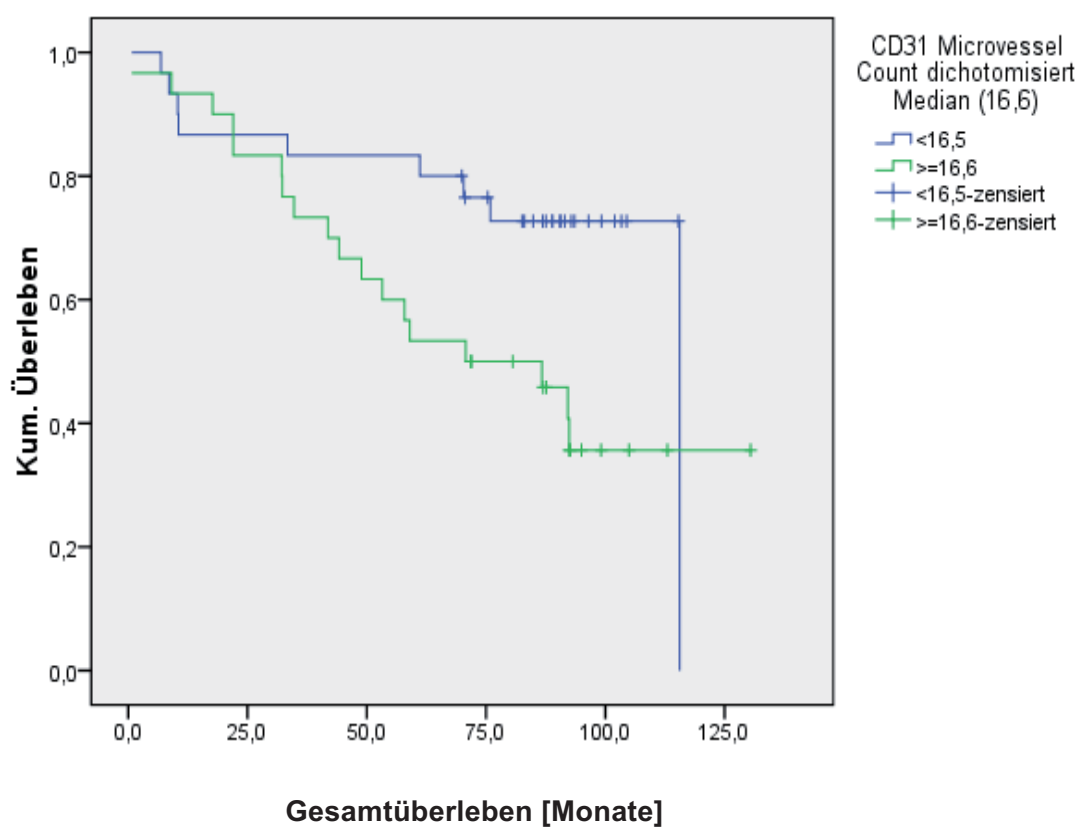


Abb. 27: Korrelation von CD 31 MVC und Gesamtüberleben.

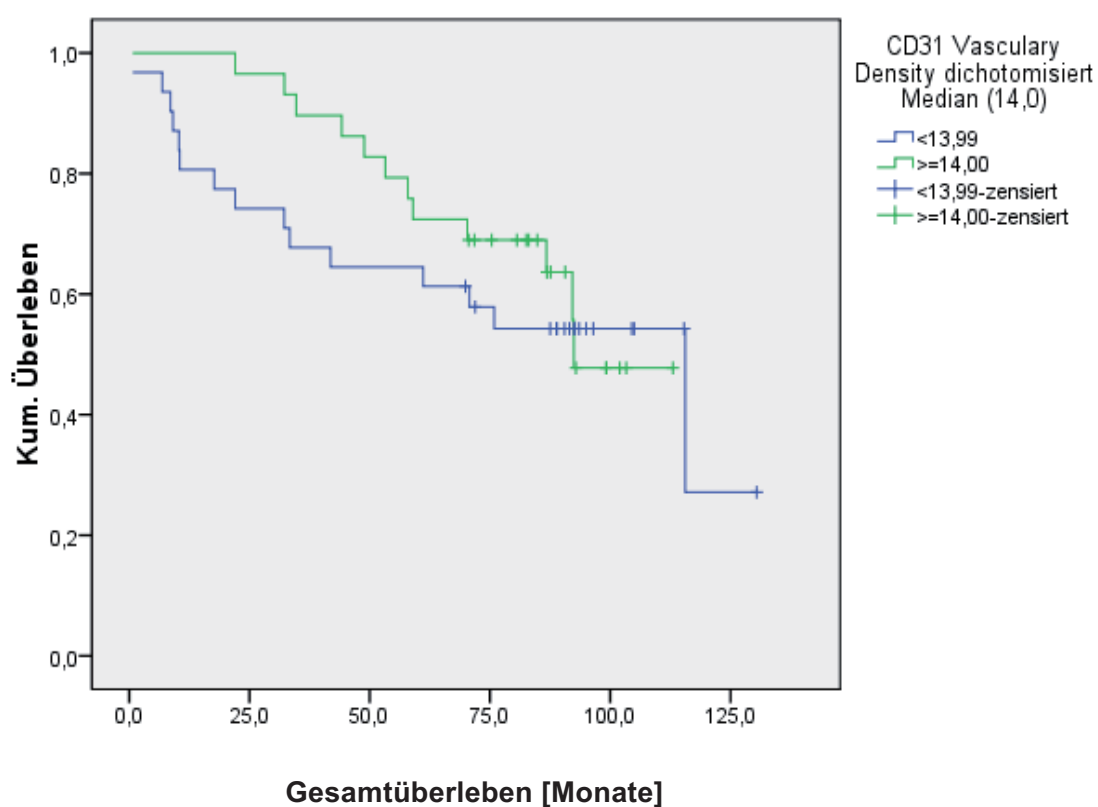


Abb. 28: Korrelation zwischen CD31 VSA und Gesamtüberleben.

3.4 Proteinexpression

3.4.1 Ergebnisse

Patient	FGFR1	FGFR2	FGFR3	FGF-1	FGF-2	ICAM-1
1	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
2	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
3	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
4	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
5	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
6	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Ja
7	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
8	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
9	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
10	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
11	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
12	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
13	Ja		Nein	Nein	Ja	Nein
14	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
15	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
16	Ja	Nein	Ja	Nein	Ja	Nein
17	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
18	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
19	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
20	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
21	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Nein
22	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
23	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
24	Ja	Nein	Nein	Nein	Ja	Nein
25	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
26	Ja	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
27	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
28	Ja	Nein	Ja			Nein
29	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein
30	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja	Nein
31		Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
32	Ja	Ja		Ja	Ja	
33	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
34	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
35	Ja	Nein	Nein			
36				Nein	Ja	Ja
37	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
38	Ja	Ja			Ja	

39	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
40				Ja		
41		Nein	Nein		Ja	
42	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
43						
44				Nein		
45		Ja	Ja	Nein	Ja	
46	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
47			Nein		Nein	
48		Ja	Nein	Nein	Ja	Nein
49	Ja	Nein	Nein	Ja	Nein	Ja
50	Ja	Nein	Nein	Ja	Ja	Ja
51				Nein		
52	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
53	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
54	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
55	Ja	Ja	Ja	Nein	Nein	Nein
56	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
57	Ja	Ja	Ja	Ja		Ja
58		Ja	Ja	Nein	Ja	Ja
59				Ja	Ja	Ja
60		Ja	Ja	Ja	Ja	Ja
61	Ja	Ja	Ja	Ja	Nein	Ja

Tab. 10: Ergebnistabelle Proteinexpression

Wie in Kapitel 2.2.5 beschrieben wurde zwischen einer positiven und fehlenden Proteinexpression der Tumorzellen unterschieden, wobei zur Auswertung nicht alle Fälle hinzugezogen wurden, da teilweise zu wenig Tumormaterial vorhanden war. Bei FGFR1 waren dies 13, bei FGFR3 8, bei FGFR4 8, bei FGF-1 6, bei FGF-2 6 und bei ICAM-1 11 Fälle. Bei der Auswertung von FGFR1 wurde in allen eingeschlossenen Urothelkarzinomen eine Proteinexpression durch die Tumorzellen ermittelt. Das Protein wurde daher von den anschliessenden Korrelationen ausgeschlossen. 35 der eingeschlossenen Tumoren exprimierten FGFR3, 18 Tumore taten dies nicht. Auch bei FGFR4 wurde in 41 Tumorfällen eine positive und in 12 eine fehlende Proteinexpression gefunden. Die Verteilung bei FGF-1 ergab 28 positive und 27 negative Fälle, bei FGF-2 dagegen wurde bei 54 eingeschlossenen Urothelkarzinomen in 50 Fällen eine Proteinexpression ermittelt. Eine ICAM-1-Expression zeigte sich bei 22 von 50 untersuchten Tumoren.

3.4.2 Korrelation Proteinexpression und Überlebenskurven

		Rezidivfreies Überleben			Gesamtüberleben		
		Gruppe A	Gruppe B	p	Gruppe A	Gruppe B	p
EGFR3	Zeit	78,45±7,84	70,13±7,91		63,07±7,84	98,78±7,66	
	N	14	19		7	24	
	Ereignis	4	16	p=0.160	11	11	p=0.021
EGFR4	Zeit	59,25±10,32	80,15±7,16		71,45±13,05	90,11±6,12	
	N	6	27		4	26	
	Ereignis	5	14	p=0.494	8	15	p=0.083
FGF-1	Zeit	70,97±8,27	82,09±8,51		84,57±8,31	84,02±7,16	
	N	16	19		15	17	
	Ereignis	10	9	p=0.628	12	11	p=0.966
FGF-2	Zeit	83,44±12,89	77,83±6,6		76,61±24,81	85,79±5,53	
	N	3	32		1	30	
	Ereignis	1	18	p=0.646	3	20	p=0.742
ICAM-1	Zeit	59,28±7,92	91,12±8,59		90,32±8,74	93,33±7,18	
	N	13	17		16	16	
	Ereignis	15	5	p=0.025	12	6	p=0.387

Tab. 11: Zeit = Mediane Überlebenszeit in Monaten. Signifikante p-Werte sind fettgedruckt. (Einteilung in Gruppe A= negativ, Gruppe B=positiv), Tabelle ohne Darstellung der Expression von FGFR1, da alle Tumorproben positiv waren.

Die Korrelation FGFR3-Proteinexpression der Tumorzellen mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben der Patienten ergab, dass statistisch signifikant mehr Patienten mit proteinexprimierenden Tumoren nach 75 Monaten noch am Leben waren (**p= 0.021**). Von ihnen lebten noch 70%, während die Patientengruppe mit fehlender Proteinexpression nur noch 40% umfasste. In Bezug auf ein rezidivfreies Überleben zeigte sich ein umgekehrtes Bild. Patienten der Gruppe A überlebten tendentiell länger rezidivfrei als Patienten der Gruppe B, wobei jedoch kein statistisch signifikanter Unterschied festgestellt werden konnte. Bei Gegenüberstellung der Ergebnisse der Korrelationsanalyse des FGFR3-Mutationsstatus kann das oben beschriebene Ergebnis nicht gefunden werden. Es zeigt sich letztendlich nur eine Tendenz zum längeren Gesamtüberleben von Patienten mit positivem Mutationsstatus.

In Bezug auf die Expression von FGFR4 ergab sich lediglich eine Tendenz zu längerem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben bei Patienten mit proteinexprimierenden Tumorzellen. Ein statistisch signifikanter Unterschied konnte jedoch nicht ermittelt werden. Ebenso zeigte sich weder für FGF-1 noch für FGF-2 eine signifikante Korrelation mit Gesamt- oder rezidivfreiem Überleben.

Bei Korrelation der Proteinexpression von ICAM-1 mit Gesamt- und rezidivfreiem Überleben wurde deutlich, dass Patienten mit vorhandener Expression statistisch signifikant länger rezidivfrei überlebten (**p= 0.025**). Nach 100 Monaten lebten über 70% der Patienten mit vorhandener ICAM-1 Proteinexpression rezidivfrei. Von den Patienten mit fehlender Expression waren es nur noch unter 40%. In Bezug auf das Gesamtüberleben zeigte sich eine ähnliche Tendenz für die ersten 80 Monate. Anschließend glichen sich die Kurven an, eine statistische Signifikanz fand sich nicht.

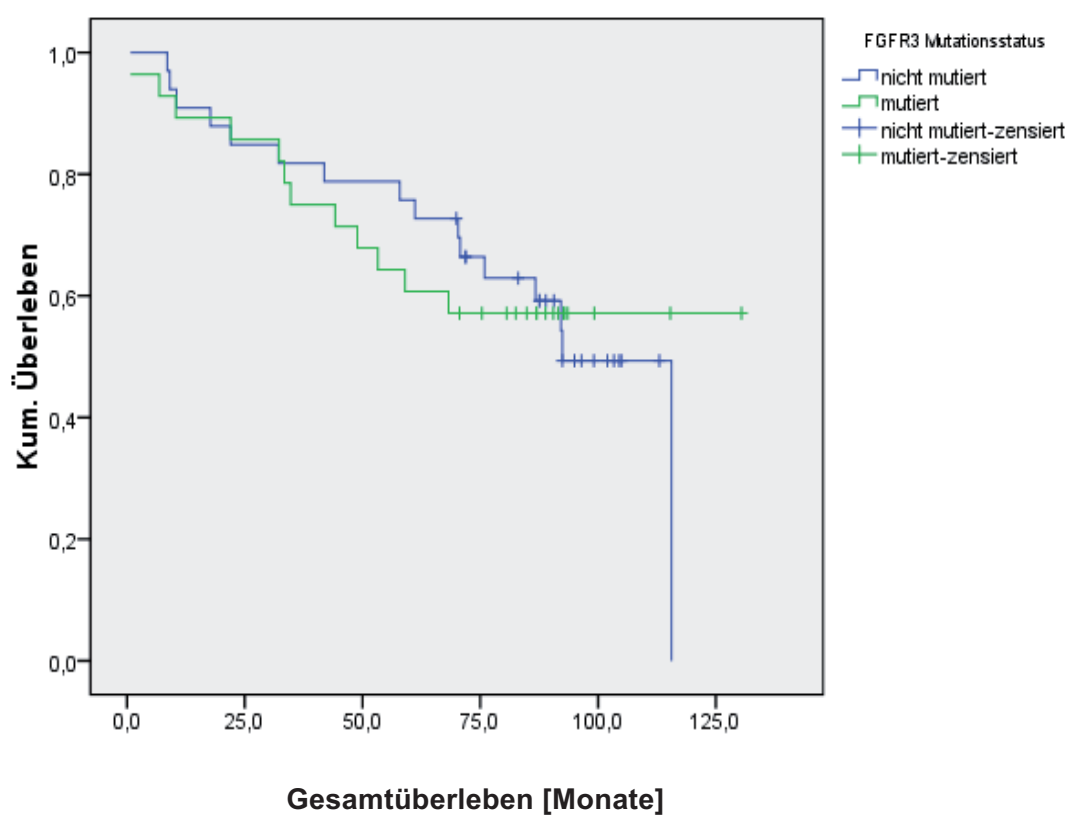
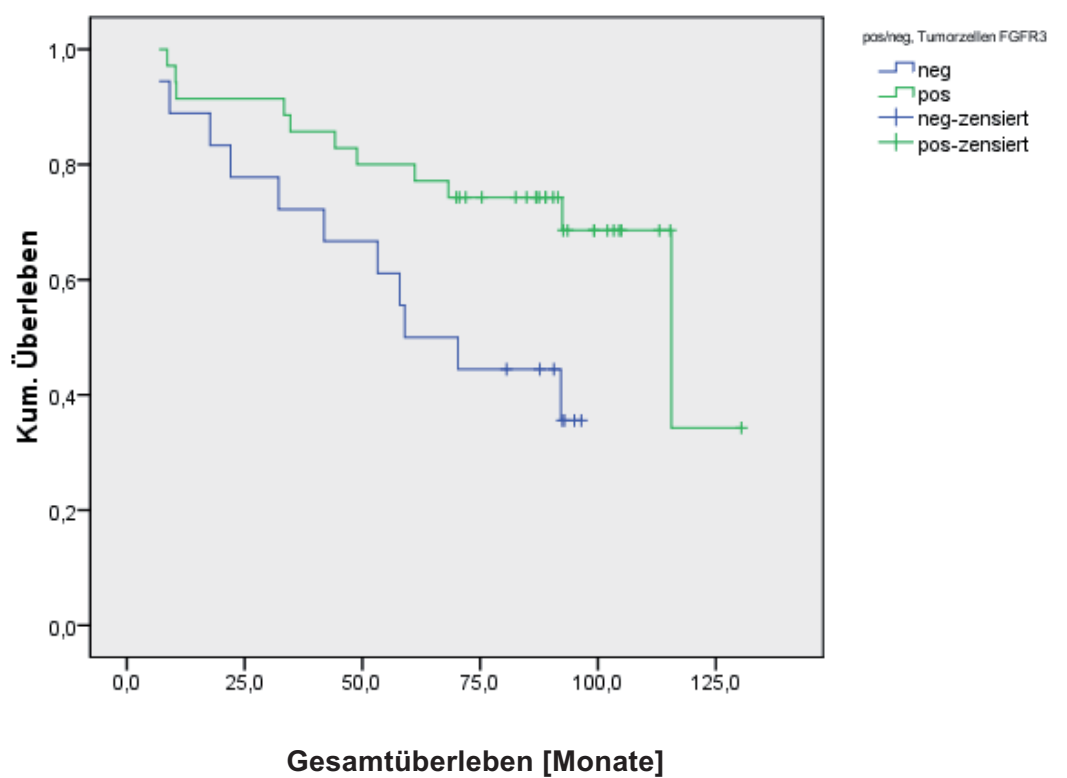


Abb. 29a/b: Vergleich Korrelation FGFR3-Expression/FGFR3-Mutationsstatus mit Gesamtüberleben.

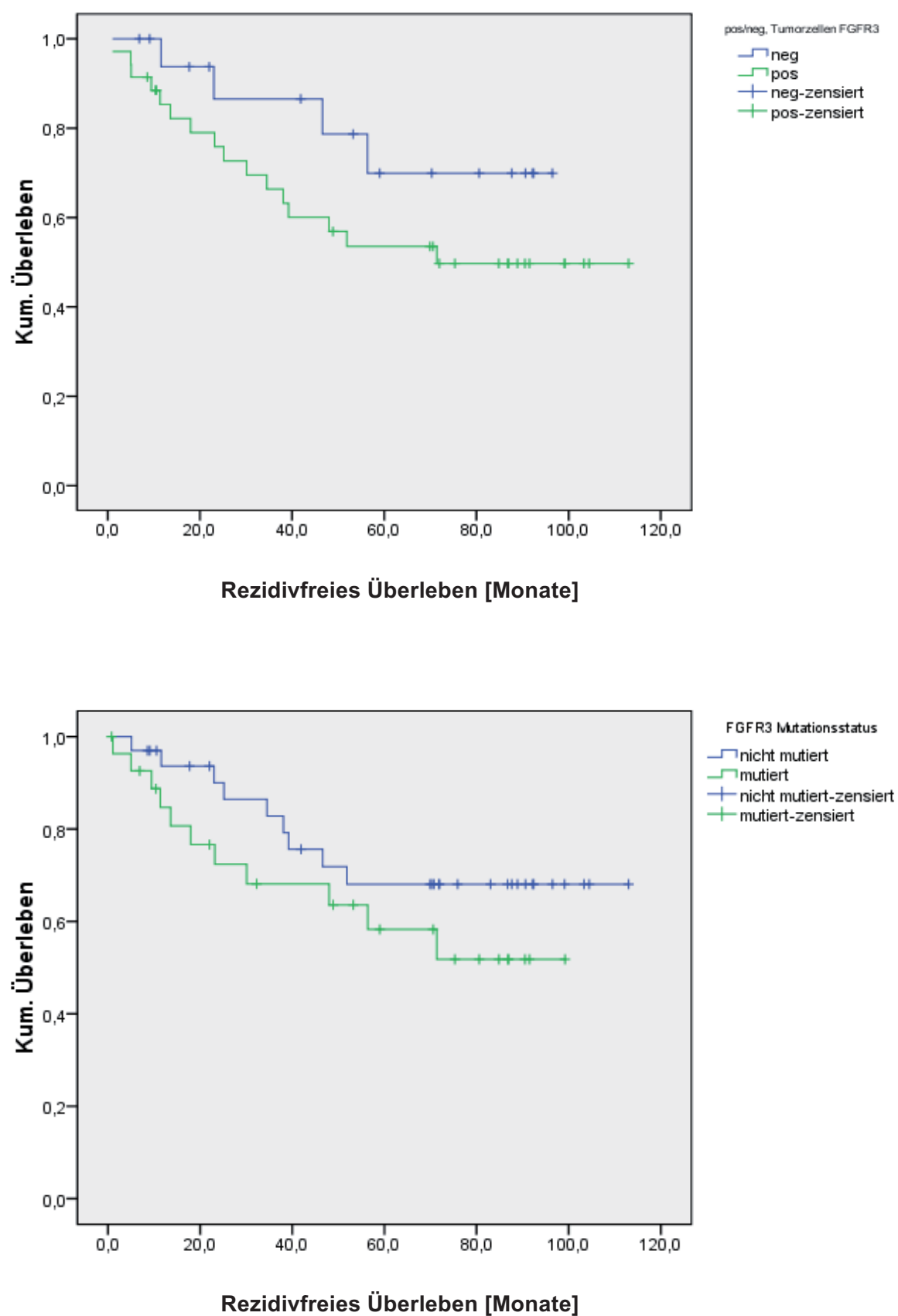


Abb. 30a/b: Vergleich FGFR3-Epression/FGFR3-Mutationsstatus mit rezidivfreiem Überleben.

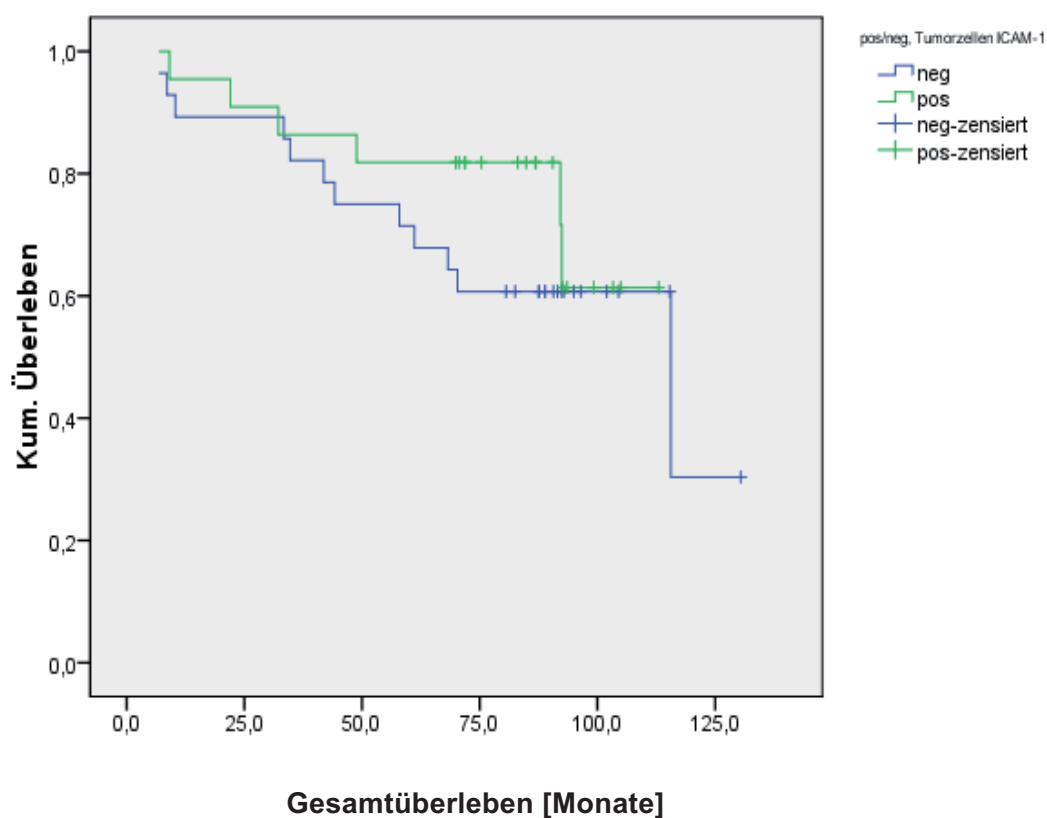


Abb. 31: Zusammenhang zwischen ICAM-1 Proteinexpression und Gesamtüberleben.

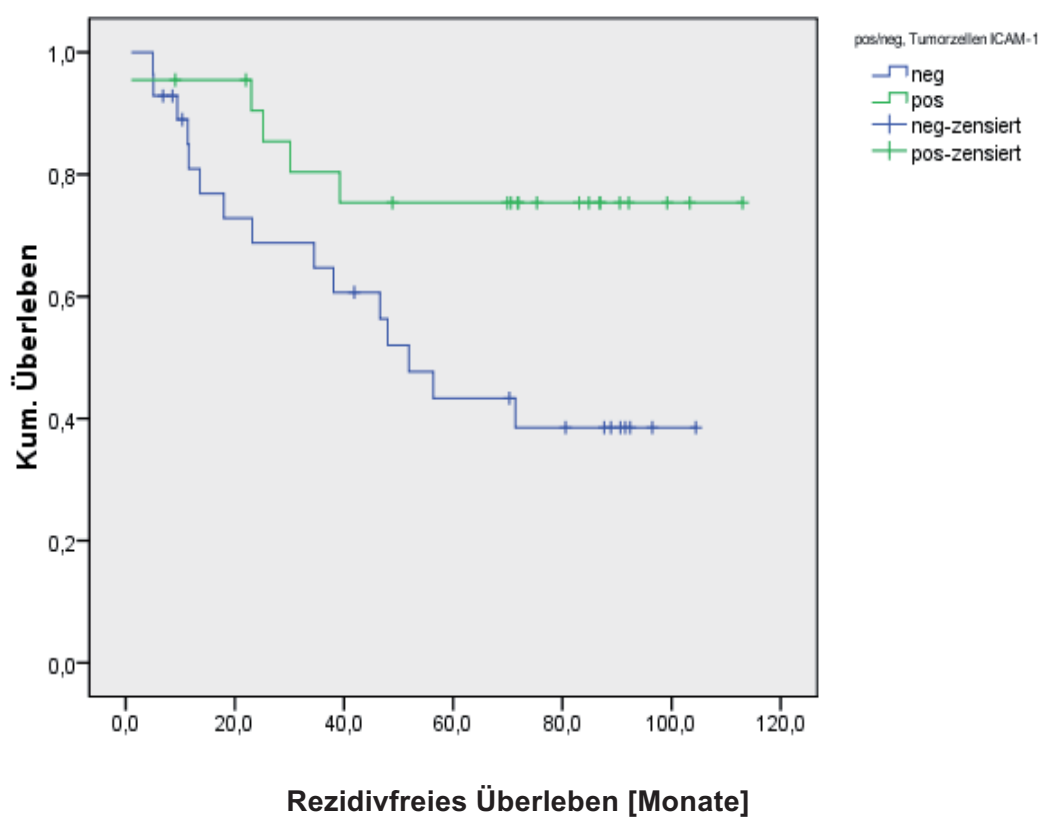


Abb. 32: Zusammenhang zwischen ICAM-1 Proteinexpression und rezidivfreiem Überleben.

3.4.3 Korrelationsanalyse der Gefäßmarker Faktor VIII/CD 31 mit der Proteinexpression der Tumorzellen

		Faktor VIII		CD 31	
		MVC	VSA	MVC	VSA
FGFR 3	CC	0.150	0.095	0.380	0.109
	<i>p</i>	0.289	0.503	0.005	0.442
	N	52	52	52	52
FGFR 4	CC	0.067	0.067	0.202	0.007
	<i>p</i>	0.637	0.637	0.150	0.959
	N	52	52	52	52
FGF-1	CC	0.019	0.236	0.191	0.0001
	<i>p</i>	0.893	0.083	0.167	1.000
	N	55	55	54	54
FGF-2	CC	0.137	0.137	0.027	0.148
	<i>p</i>	0.326	0.326	0.847	0.289
	N	53	53	53	53
ICAM - 1	CC	0.045	0.242	0.213	0.265
	<i>p</i>	0.755	0.091	0.141	0.066
	N	50	50	49	49

Tab. 12: MVC = microvessel count, VSA = vascular surface area , CC = Korrelationskoeffizient. Signifikante p-Werte sind fett gedruckt (Spearman's rho test). Darstellung der Tabelle ohne FGFR1 aufgrund Positivität aller Fälle.

Bei Korrelation von Gefäßmarkern mit Proteinexpression der Tumorzellen konnten statistisch signifikant höhere MVC-Werte für CD31 (**p= 0.005**) bei Tumoren ohne FGFR3 Proteinexpression ermittelt werden. Für den VSA-Wert von CD31 und Faktor VIII konnte keine derartige Beobachtung gemacht werden. Auch für die übrigen Proteine konnte kein signifikantes Ergebnis ermittelt werden.

4 Diskussion

4.1 Kritische Betrachtung von Material, Methoden und Auswertung

Die Erhebung sämtlicher histopathologischer und klinischer Parameter des Patientenkollektivs erfolgte anhand des PAS-Systems des Instituts für Pathologie der Universitätsklinik Regensburg. Obwohl Tumorstadium und –differenzierungsgrad etablierte zu beurteilende Faktoren sind, können bei der histologischen Beurteilung Probleme durch Tumorlokalisation, Artefakte durch die Schnittpräparation oder Gewebstraumatisierung bei Entnahme auftreten (Mian et al. 2006). Vergleichsuntersuchungen des gleichen Schnittpräparates bei verschiedenen pathologischen Instituten können zu verschiedenen Resultaten führen, wobei vor allem das Tumorgrading einer hohen intraindividuellen und interindividuellen Variabilität unterliegt (Ooms et al. 1983). Tumorpräparate sollten daher möglichst unabhängig von zwei Pathologen bewertet werden. Es stellt sich zudem die Frage nach der richtigen Grösse des zu untersuchenden Patientenkollektivs, da die ermittelten Ergebnisse möglichst repräsentativ sein sollten. Diese Kritikpunkte sollten bei der folgenden Diskussion berücksichtigt werden.

Für die kritische Betrachtung der in den Niederlanden entwickelten FGFR3-Mutationsanalyse sei auf die Diskussion bei van Oers et al. (2005) verwiesen.

Die Verwendung von Tissue-Micro-Arrays (TMAs) zu immunhistochemischen Detektierung der Proteinexpression birgt Vor- und Nachteile. Die für die einzelnen Untersuchungen relevanten Tumorareale werden dabei aus den jeweiligen Proben herausgestanzt und zusammen neu eingebettet. Ein Schnitt dieser neuen Blöcke zeigt daher mehrere relevante Tumorareale gleichzeitig. Dadurch lassen sich Kosten für wertvolles Tumorgewebe reduzieren und die Vergleichbarkeit der Proben untereinander verbessern, da alle Gewebeproben mit der gleichen Prozedur behandelt werden. So treten kaum interexperimentelle Unterschiede auf (Handbuch, Fa. Zytomed). Am bedeutsamsten ist dabei jedoch dass das herausgestanzte Areal repräsentativ für das restliche Gewebe ist. Die Repräsentativität gilt daher auch als Hauptkritikpunkt dieser Methode. Eine genaue Vorauswahl und exakte Arbeitsweise sind daher nötig. In grösseren Evaluierungsstudien konnte zudem gezeigt werden, dass gestanzte Gewebeproben aus grösseren heterogenen Tumoren signifikant repräsentativ für das gesamte Tumorgewebe waren (Moch et al. 2001) (Nocito et al. 2001) (Tzai et al. 2003). Zudem handelt es sich bei den in der vorliegenden Arbeit untersuchten Urothelkarzinomen um morphologisch kleinere Läsionen. Die hier

gestanzten Gewebeproben sollten daher als repräsentativ für das gesamte Tumorgewebe angesehen werden und die damit gewonnen Ergebnisse als verwertbar eingestuft werden.

Für die Quantifizierung der Tumurvaskularisation ist das Detektieren der am stärksten vaskularisierten Tumorareale der wichtigste Faktor für das Auszählen der Gefässe. Dabei wurde nach einem etablierten Protokoll von Weidner et al. (1991,1993) verfahren. Um falsche Ergebnisse zu vermeiden, wurden alle Schnitte mehrfach lichtmikroskopisch in verschiedenen Vergrößerungsstufen durchgemustert um die geeigneten Areale zu identifizieren. Anschliessend wurden 3 bis 5 repräsentative Fotos dieser Bereiche aufgenommen und nur Präparate guter Farbqualität mit fehlender oder geringer Hintergrundfärbung fanden Verwendung. Zusätzlich wurden nur sicher von unspezifisch angefärbten Tumor- oder Bindegewebszellen zu unterscheidende Mikrogefässe in die Auswertung einbezogen, um falsch positive Ergebnisse zu vermeiden. Die Ergebnisse der Quantifizierung der Tumurvaskularisation sollten daher als repräsentativ eingestuft werden.

Bei der Detektierung der Proteinexpression der Tumorzellen mithilfe immunhistochemischer Färbungen der Tissue-Micro-Arrays wurde lichtmikroskopisch anhand prozentualer Anfärbung der Tumorzellen in verschiedene Kategorien eingeteilt. Zur Kontrolle der Einteilung wurden die Präparate dabei von zwei unabhängigen Pathologen parallel analysiert. Für die statistische Auswertung wurden die Ergebnisse dichotomisiert und in vorhandene und fehlende Proteinexpression unterschieden. Eine Unterscheidung verschiedener Expressionslevel wurde anfangs vorgenommen, fand jedoch bei der anschliessenden statistischen Auswertung aufgrund der Fallzahlen keine Verwendung.

Beim Vergleichen und Einordnen der Analysen in bisher veröffentlichte Studienergebnisse wird das Problem der Vergleichbarkeit deutlich. Durch die Anwendung verschiedener Methoden (Reproduzierbarkeit, Scoring-Systeme), Studiengrössen oder Studienendpunkte (disease-free survival (DFS), recurrence-free survival (RFS), overall-survival (OS) und progression-free-survival (PFS)) entstehen Probleme im direkten Vergleich. Zudem finden Materialien verschiedenster Hersteller in der gleichen Methode Anwendung (zum Beispiel Antikörper). Auch das Outcome der Patienten und die dadurch entstandenen Eckdaten einiger statistischer Korrelationen sind abhängig von der unterschiedlichen Therapie der Patienten nach Diagnose (Chemotherapie etc.), wobei diese vom jeweiligen Stand der Wissenschaft, den örtlichen Gegebenheiten wie auch dem Wunsch des Patienten abhängt. Mit dem Wissen um eben genannte Schwierigkeiten sollen nun bisherige Forschungserkenntnisse mit den Ergebnissen der vorliegenden Arbeit diskutiert werden.

4.2 FGFR3-Mutationsstatus, klinische/klassische histopathologische Daten und Angiogenese

Seit der ersten Beschreibung der FGFR3-Mutation in Urothelkarzinomen wurden in den letzten Jahren zahlreiche Studien zu deren Frequenz und Spektrum in Urothelkarzinomen unterschiedlichster Tumorstadien und Differenzierungsgrade veröffentlicht. Von Hernandez et al. (2006), Jebar et al. (2005) oder van Rhijn et al. (2003) belegten dabei einen statistisch signifikanten Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutation und Tumorstadium bzw. – Differenzierungsgrad. Tumoren mit nachgewiesener Mutation wiesen ein überwiegend papilläres nicht-invasives Tumorwachstum auf und waren zum grössten Teil gut differenziert. Die beiden folgenden Abbildungen zeigen die Zusammenfassung der Ergebnisse unterschiedlichster Studien bezüglich FGFR3-Mutationsstatus und Assoziation mit histopathologischen Parametern.

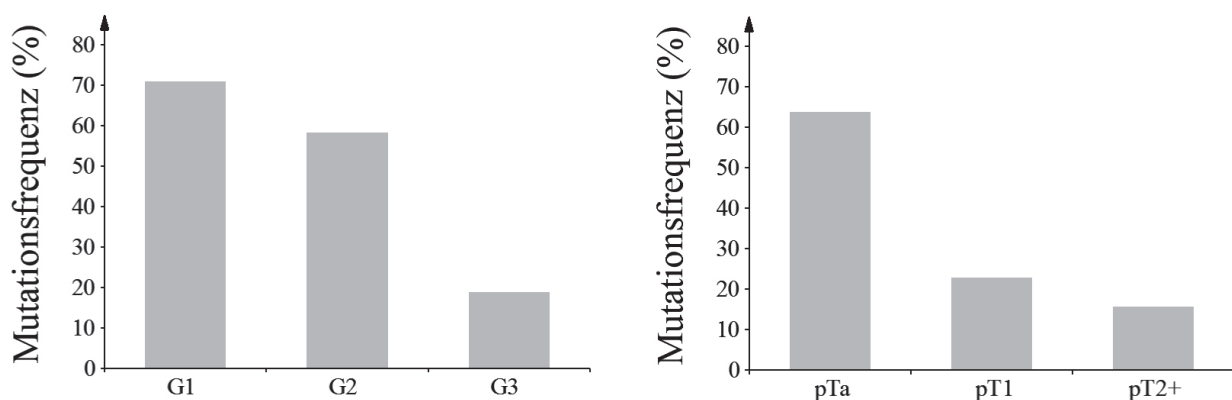


Abb. 32a/b: Daten aus folgenden Studien: Billerey et al. (2001), van Rhijn et al. (2003), Hernandez et al. (2006), Lamy et al. (2006), Jebar et al. (2005), Lindgren et al. (2006)

Eine Assoziation zwischen FGFR3-Mutation und Low-Grade und Low-Stage-Tumoren findet sich auch in den Arbeiten von Bakkar et al. (2003), van Rhijn et al. (2004) und Mhaweche-Fauceglia et al. (2006). In einer Studie zeigten beispielsweise 43% der pTa-Tumoren eine FGFR3-Mutation, während nur 12,5% der pT2+-Tumoren positiv für eine solche getestet wurden (Kimura et al. 2001). Eine andere Arbeit ermittelte in 47% der G1/G2-Tumoren eine FGFR3-Mutation während in G3-Tumoren keine gefunden werden konnte (van Rhijn et al. 2001). Bei 132 Urothelkarzinomen konnten Billerey et al. (2001) eine höhere Mutationsfrequenz in pTa als in pT1 oder pT2+ Tumoren ermitteln. Zudem fanden sie eine

signifikante Assoziation von FGFR3-Mutation und Tumordifferenzierungsgrad ($p=0.0001$). Wie im vorherigen Kapitel genauer beschrieben kommt diese Arbeit zu ähnlichen Ergebnissen. Ebenso wie in den oben genannten Arbeiten besitzt der überwiegende Teil der positiv auf eine FGFR3-Mutation getesteten Patienten ein nicht-invasives pTa- und bei invasiven Tumoren eher ein pT1- als ein pT2-Tumorstadium sowie einen hohen Tumordifferenzierungsgrad. Obwohl sich diese Ergebnisse damit gut in die Ergebnisse vieler veröffentlichter Studien einordnen lassen, kommt eine kleine Anzahl von Arbeiten jedoch zu gegenteiligen Ergebnissen. So wurde in einer Studie von Lamy et al. (2006) interessanterweise eine höhere FGFR3-Mutationsfrequenz in G2- als in G1-Tumoren festgestellt.

Da sich das Management vor allem von nicht-invasiven Urothelkarzinomen (pTa) in Bezug auf die Voraussagung von Rezidiven oder Tumorprogression (Patientenüberleben) schwierig gestaltet, wird intensiv nach prognostischen und prädiktiven Biomarkern gesucht. In Bezug auf den FGFR3 Mutationsstatus finden sich dazu zahlreiche Studien mit teils gegenteiligen Ergebnissen. Eine grosse Anzahl von Studien ermittelte den FGFR3-Mutationsstatus als potentiellen prädiktiven Marker für die Entstehung eines Rezidivs solcher oberflächlichen Tumore. Eine anfängliche Untersuchung von 57 mutierten Patienten mit einem pTa und pT1 Stadium zeigte eine niedrige Rezidivrate (van Rhijn et al. 2001). In einer Arbeit von Lamy et al. (2001) konnten diese Ergebnisse nicht bestätigt werden, ein Zusammenhang zwischen FGFR3-mutierten pTa und pT1-Tumoren und einer erhöhten Rezidivrate fand sich nicht. Später folgende Studien kamen zudem zu gegenteiligen Ergebnissen (Hernandez et al. 2006) (Zieger et al. 2005). So ermittelte eine grosse spanische Studie ($n > 700$) einen signifikanten Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationen in pTaG1-Urothelkarzinomen und einer erhöhten Rezidivrate (Hernandez et al. 2006). Die Tendenz zu einer erhöhten Rezidivrate zeigte sich dort ebenfalls bei Untersuchung von pTaG2-Tumoren, statistisch signifikant war das Ergebnis jedoch nicht. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit müssen ähnlich eingeordnet werden. Wie die Kaplan-Meier-Kurve in Abb. 23 zeigt, korrelierte der FGFR3-Mutationsstatus nicht statistisch signifikant mit einem rezidivfreien Überleben, jedoch zeigten Patienten mit positivem Mutationsstatus eine leichte Tendenz zu einer erhöhten Rezidivrate. Insgesamt schien gerade auch in der Gruppe der nicht invasiven Urothelkarzinome eine FGFR3-Mutation eher mit einem erhöhten Risiko für ein Rezidiv einherzugehen.

Die in dieser Arbeit ermittelten Ergebnisse der Korrelation FGFR3-Mutationsstatus und Gesamtüberleben der Patienten weisen ebenfalls keinen statistisch signifikanten

Zusammenhang auf. Wie die Kaplan-Meier-Kurve der Abb. 22 zeigt, überlebten in den ersten 100 Monaten der Nachbeobachtungszeit tendenziell mehr Patienten mit Wildtyp-Tumoren. Danach zeigten die mutierten Patienten ein höheres Gesamtüberleben. Daher scheinen sich FGFR3-Mutationen, obwohl eher mit günstigerer Histopathologie assoziiert, nicht unbedingt positiv auf das Überleben und sogar tendenziell gegenteilig auf das rezidivfreie Überleben auszuwirken. Der genaue Einfluss einer FGFR3-Mutation bleibt daher zu klären.

Auch der Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutation und Tumorangiogenese ist derzeit noch nicht ausreichend geklärt, Studien über den Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationsstatus und Tumorangiogenese gibt es nicht. In der vorliegenden Arbeit konnte ein statistisch signifikanter Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutation und dem VSA-Wert von Faktor VIII gefunden werden ($p=0.019$). In Tumoren mutierter Patienten wurde eine stärkere Tumervaskularisation festgestellt als bei Wildtyppatienten. Aufgrund dieser Ergebnisse könnte von einer positiven Stimulation der Tumorangiogenese durch die Mutation des FGF-Rezeptors ausgegangen werden, was die oben beschriebenen Zusammenhänge zwischen Mutationsstatus und erhöhtem Rezidivrisiko erklären könnte. Durch die Mutation des FGF-Rezeptors kommt es zu einer Liganden-unabhängigen Dimerisierung des Rezeptors, womit die Angiogenese der Zellen beeinflusst wird. Da in dieser Arbeit statistisch signifikante Ergebnisse jedoch nur für einen einzelnen Angiogenesemarker gefunden werden konnten, bleibt der genaue Zusammenhang zwischen einer FGFR3-Mutation und deren Einfluss auf die Tumorangiogenese zu klären.

4.3 FGFR3-Mutation, Proteinexpression und klinische Parameter

Fibroblastenwachstumsfaktoren (FGFs) und ihr Rezeptoren spielen bei unterschiedlichsten Prozessen wie Wundheilung, Embryonalentwicklung, Chemotaxis, Zelldifferenzierung und Angiogenese sowie in der Signalkaskade der Zellen eine wichtige Rolle. Einigen Autoren zufolge sei es daher nicht verwunderlich, dass genetische Strukturalterationen oder Veränderungen der Proteinexpression die Entstehung verschiedenster Tumoren beeinflussen können (van Rhijn et al. 2002) (Webster et al. 1997). Durch Überexprimierung von FGFR- und FGF-Proteinen kann eine Liganden-unabhängige Aktivierung der Signalkaskade ausgelöst werden. Diese interagieren miteinander und sind in der Lage sich gegenseitig zu phosphorylieren. Eine erhöhte Expression von FGFs oder FGFRs kann daher zu einer autokrinen oder parakrinen Zellstimulation führen. Wenn eine FGFR-exprimierende Zelle

gleichzeitig ihren dazugehörigen Liganden exprimiert, kommt es zur autokrinen Aktivierung und die Tumorzelle wächst eigenständig (Turner et al. 2010). Das Binden eines FGF an einen Rezeptor induziert dessen Dimerisierung und unterschiedlichste Signalkaskaden werden initiiert: Erhöhung intrazellulärer Calciumlevel, Induktion mitogen-aktivierter Proteinkinasen und des Proteinkinase C Pathways, Stimulation der Adenylatcyclase und Induktion der Protoonkogene c-myc und c-fos (Powers et al. 2000). Sollte die Tumorzelle einen anderen FGF-Rezeptor überexprimieren kann sie auch parakrin durch exprimierte FGFs benachbarter Zellen stimuliert werden. Die Überexpression resultiert dabei oft aus einer Amplifikation bestimmter Genabschnitte, wobei zahlreiche Genkopien entstehen. Beispielsweise besitzen ungefähr 10% der Patienten mit Mamma-Tumoren den FGFR1-tragenden amplifizierte 8p11-12 Genabschnitt, was mit einer FGFR1-Überexpression einhergeht. Demgegenüber steht jedoch eine verminderte Proteinexpression in einigen Tumorentitäten, so dass FGFRs auch als eventuelle Tumorsuppressoren diskutiert wurden (Turner et al. 2010).

Erhöhte Proteinlevel von FGFRs und FGFs wurden vor allem für FGFR3 in einigen Studien beschrieben, doch gibt es aktuell nur wenige Veröffentlichungen die mittels Immunhistochemie die Proteinexpression von FGFRs und FGFs in Urothelkarzinomen untersuchten. Da nicht für jedes Mitglied der FGFR-Familie ein Antikörper existiert, wurde in einigen Studien die relative Expression verschiedener FGFRs mithilfe der Reversen Transkriptase PCR (RT-PCR) ermittelt. Dabei konnte gezeigt werden, dass FGFR3 der am häufigsten zu findende FGF-Rezeptor in normalen Urothelzellen ist. Weniger hohe Level wurden für FGFR1, 2 und 4 gemessen. Wurden die normalen Urothelzellen kultiviert, stiegen die Level von FGFR2 und 4. FGFR3 blieb jedoch der vorherrschende Rezeptor (Tomlinson et al. 2005). Mithilfe immunhistochemischer Detektion mit einem Antikörper für FGFR3 konnte gezeigt werden, dass normales Urothel aus Ureter und Harnblase eine niedrige oder keine FGFR3-Proteinexpression zeigt (Tomlinson et al. 2007). Matsumoto et al. (2004) untersuchten eine grosse Anzahl von Urothelkarzinomen mithilfe der Immunhistochemie auf eine FGFR3-Proteinexpression. Dabei wurde in 49,2% der Tumoren eine Proteinexpression festgestellt. Gleichzeitig konnte in zwei Gruppen unterschieden werden: Nicht-invasive und gut differenzierte Tumoren zeigten eine Proteinexpression, invasive und weniger differenzierte Tumoren dagegen nicht. Es konnte jedoch keine statistisch signifikante Korrelation zwischen FGFR3-Proteinexpression und Prognose der Patienten gefunden werden. Sie schlossen daraus, dass eine erhöhte FGFR3-Proteinexpression in Urothelkarzinomen als prognostischer Faktor allein nicht zu gebrauchen sei. Zu ähnlichen Ergebnissen kamen Mhawech-Fauceglia et al. (2006), die eine Assoziation zwischen FGFR3-

Proteinexpression der Tumorzellen und Tumorstadium bzw. -Differenzierungsgrad ermittelten, eine vorhandene Proteinexpression jedoch ebenfalls nicht als prognostischen Faktor werten konnten. Gomez-Roman et al. (2005) nutzten Microarrays um FGFR3-mRNA Expression von nicht-invasiven, invasiven und muskelinvasiven Urothelkarzinome zu untersuchen. Die FGFR3-Proteinexpression wurde dabei mittels Immunhistochemie und Western-Blot untersucht. Eine Überexpression von FGFR3-mRNA konnte dabei in pTa, pT1 und pT2-Tumoren festgestellt werden. Zudem zeigte der Western-Blot bei 83% der pTa, 100% der pT1 und 50% der pT2-Tumoren eine Proteinexpression. Mittels Immunhistochemie waren es 71,4% der pTa-, 72% der pT1- und 49,2% der pT2-Tumoren. 2008 ermittelten Knowles et al. immunhistochemisch die FGFR3-Proteinexpression bei Patienten mit bekanntem Mutationsstatus. Sie unterteilten dabei in vier verschiedene Expressionskategorien, wobei auch Tumoren mit fehlender Proteinexpression eingeschlossen wurden. Im Gegensatz zum Kontrollurothel aus Ureter oder Harnblase fand sich dabei in den Tumoren eine erhöhte Proteinexpression von FGFR3. 85% der mutierten Tumoren zeigten eine hohe Proteinexpression, was einen Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutation und FGFR3-Proteinexpression vermuten lies. Und wie auch die FGFR3-Mutation eher mit einem geringerem Tumorstadium und –Grad assoziiert war, konnten ähnliche Ergebnisse auch in Bezug auf die FGFR3-Proteinexpression ermittelt werden. Bei nicht-invasiven gut differenzierten Tumoren war die FGFR3-Expression signifikant höher. Lindgren et al. (2006) bestätigten diese Ergebnisse in einer Microarray-Studie. Interessanterweise zählten sie jedoch zahlreiche Wildtyp-Tumoren mit erhöhter Proteinexpression, von denen 44% ein muskelinvasives Wachstum zeigten. Auch in der Studie von Knowles et al. (2008) konnte bei einer ganzen Anzahl von Wildtypumoren eine FGFR3-Proteinexpression detektiert werden, wobei sich die meisten dieser Tumore in einem höheren Tumorstadium befanden (9% pTa, 19% pT1 und 28% pT2). Aufgrund dieser Ergebnisse wurde vermutet dass der Verlust der Proteinexpression zu signifikanten biologischen Veränderungen im Tumor führen kann. Die vorher beschriebenen Ergebnisse können in der vorliegenden Arbeit nur teilweise bestätigt werden. Bei 53 der 61 Patienten konnte die FGFR3-Proteinexpression ermittelt werden. Dabei fand sich bei 36 Tumoren eine Proteinexpression von FGFR3 mit zu 77% einem oberflächlichem nicht invasivem pTa und zu 23% einem pT1-Stadium. Diese Ergebnisse unterstützen daher die oben genannten Studien, nach denen eine erhöhte FGFR3-Proteinexpression eher mit einem besseren Tumorstadium assoziiert ist. Bei pT2-Tumoren konnte keine Proteinexpression ermittelt werden. In Bezug auf den Mutationsstatus fand sich dagegen kein unterschiedliches Expressionsprofil. 26 der 53 in die Untersuchung mit

einbezogenen Urothelkarzinome waren mutiert, bei 76% wurde eine erhöhte Proteinexpression ermittelt. Es lässt sich folglich ein Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutation und FGFR3-Expression erkennen, jedoch exprimierten 59% der Wildtyptumoren ebenfalls das FGFR3-Protein.

Zu ähnlichen Ergebnissen kamen auch Tomlinson et al. (2007) bei Korrelation des FGFR3-Mutationsstatus mit der FGFR3-Proteinexpression. Sie ermittelten eine signifikante Assoziation zwischen FGFR3-Expressionlevel und FGFR3-Mutationsstatus ($p < 0.0001$) mit hohen FGFR3-Proteinleveln in mutierten Tumoren. Insgesamt zeigten 85% der mutierten Tumoren eine Proteinexpression, von denen befanden sich die meisten in einem niedrigen Tumorstadium und waren gut differenziert. Jedoch exprimierten auch 42% der Wildtyptumoren vermehrt FGFR3, der überwiegende Anteil von ihnen zeigte dabei ein invasives Tumorwachstum. Eine signifikante Assoziation von FGFR3-Expression und Rezidivrate ergab sich dabei nicht, das Gesamtüberleben wurde nicht untersucht. In der vorliegenden Arbeit konnte sowohl bei Tumoren mit Proteinexpression von FGFR3 als auch bei mutierten Tumoren ein tendenziell erhöhtes Rezidivrisiko ermittelt werden. Beim Vergleich des Zusammenhangs FGFR3-Mutation und FGFR3-Proteinexpression mit dem Gesamtüberleben überlebten zwar Patienten mit FGFR3-Proteinexpression statistisch signifikant länger ($p = 0.021$), was jedoch in Bezug auf das Gesamtüberleben von mutierten Patienten nicht bestätigt werden konnte. Und obwohl in einer Studie von Agazie YM et al. (2003) die FGFR3-Proteinexpression generell mit einer schlechten Prognose assoziiert war, lässt sich der FGFR3-Proteinexpression durch die hier ermittelten Ergebnissen kein prognostischer Wert zuschreiben. Aufgrund des Nachweises einer FGFR3-Proteinexpression vor allem in pTa und pT1-Tumoren, sowie der Assoziation mit einem erhöhten Rezidivrisiko, bedarf somit die Klärung der Auswirkung einer FGFR3-Proteinexpression auf die Tumorprogression weiterer Untersuchungen.

Ein Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutation und Proteinexpression anderer FGFRs, FGFs oder Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 wurde bis dato nicht beschrieben. Tomlinson et al. (2005) ermittelten niedrige Level für FGFR1 und 2 in normalem Urothel. Und obwohl ältere Studien beispielsweise erniedrigte oder fehlende FGFR2-Proteinlevel in Urothelkarzinomen fanden (De Medina et al. 1997), konnten neuere Studien eine vermehrte Proteinexpression sowohl von FGFR1, FGFR2 als auch von FGF-2 in Urothelkarzinomen aufzeigen (Tomlinson et al. 2007) (Marzioni et al. 2009) (Tomlinson et al. 2009). Dem bisher häufig untersuchten FGFR1 wurde demnach eine Rolle bei der Entstehung von Urothelkarzinomen zugesprochen.

Laut einer experimentellen Studie von Tomlinson et al. (2009) ging die Proteinexpression von FGFR1 in normalen urothelialen Zellen mit vermehrter Zellproliferation und längerem Überleben einher. Nach subkutaner Injektion von FGFR1-knockdown Zellen in Mäuse konnte verglichen mit Kontrollzellen ein vermindertes Tumorwachstum beobachtet werden. Dem FGFR1-Protein wurde daher eine tumorfördernde Wirkung zugesprochen und als möglicher therapeutischer Ansatzpunkt mancher Urothelkarzinome gemutmasst. Über den Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationsstatus und FGFR1-Proteinexpression der Tumorzellen gibt es noch keine Publikationen. Da in der vorliegenden Arbeit in allen Fällen eine erhöhte Proteinexpression für FGFR1 ermittelt wurde, war eine statistische Auswertung nicht sinnvoll.

Ein Zusammenhang zwischen FGFR3-Mutationsstatus und Proteinexpression von FGFR4, FGF-1 und FGF-2 wurde in der aktuellen Literatur noch nicht untersucht. Die folgenden Ergebnisse können daher nicht vergleichend diskutiert werden. In der vorliegenden Arbeit konnte bei 53 der 61 Patienten die FGFR4-Proteinexpression ermittelt werden, wobei 79% (42) der Tumore FGFR4 exprimierten. Die Verteilung bezüglich des FGFR3-Mutationsstatus ergab bei den 42 Patienten je 50% Mutanten und Wildtypumore. In 55 Fällen konnte je ein Expressionsprofil von FGF-1 und 2 erstellt werden. Dabei zeigten 50% eine Expression von FGF-1, 92% von FGF-2. Von 18 Tumoren mit FGF-1-Expression waren 50% mutiert, 50% Wildtyp. Von 50 Patienten mit FGF-2-Expression waren 58% mutiert, 42% Wildtyp. Demnach besitzt der FGFR3-Mutationsstatus keinen Einfluss auf die Expression von FGF-1, FGF-2 oder FGFR4 der Tumorzellen. Ein Zusammenhang zwischen Proteinexpression und Gesamt- oder Rezidivfreiem-Überleben konnte in der vorliegenden Arbeit ebenfalls nicht gefunden werden. Daher kann einer Proteinexpression von FGF-1, FGF-2 oder FGFR4 anhand der vorliegenden Ergebnisse kein prognostischer Wert zugesprochen werden.

Auch Untersuchungen über den Zusammenhang zwischen ICAM-1 Proteinexpression und FGFR3-Mutationsstatus sind nicht bekannt. Zelladhäsionsmoleküle wie ICAM-1 spielen eine wichtige Rolle in der Organogenese, der Wundheilung, Entzündungsprozessen und der Progression maligner Tumoren. Bisherige Studien untersuchten vor allem lösliches ICAM-1 im Serum von Patienten mit Urothelkarzinomen. Coskun et al. (2006) fanden bei Tumorpatienten signifikant höhere ICAM-1 Werte im Serum als bei Kontrollgruppen. Ein Zusammenhang mit dem Tumorstadium oder dem Differenzierungsgrad ergab sich jedoch nicht. Aboughalia kam 2006 zu ähnlichen Ergebnissen und sprach dem Monitoring von löslichem ICAM-1 im Serum oder Urin bei bestimmten Patientengruppen mit noch nicht

invasiven Tumoren eine grosse Bedeutung zu (Aboughalia 2006). Eine vorherige Studie konnte diese Ergebnisse noch nicht zeigen. Griffiths et al. (1996) ermittelten in 40 Urothelkarzinomen lösliches ICAM-1 im Serum und fanden keine höheren Werte als in Kontrollgruppen. 2009 wurden von Mitra et al. unterschiedliche Genüberexpressionen in Urothelkarzinomen bestimmt und mit histopathologischen und klinischen Parametern korreliert, eine ICAM-1-Überexpression war dabei mit einer schlechteren Prognose assoziiert. Immunhistochemische Untersuchung zur ICAM-1 Proteinexpression von Urothelkarzinomzellen gibt es nur wenige. Roche et al. (2003) ermittelten die ICAM-1 Proteinexpression der Tumorzellen wie in der vorliegenden Arbeit mithilfe immunhistochemischer Färbungen. Eine ICAM-1 Expression war dabei statistisch signifikant mit einem histologisch infiltrativen Typ assoziiert. Sie schlussfolgerten, dass eine Interaktion von ICAM-1 mit Fibrinogen die Migration von Tumorzellen entlang von Endothelien fördere. Die vorliegende Arbeit kommt zu eher gegenteiligen Ergebnissen. 51 Fälle wurden auf eine ICAM-1-Expression hin untersucht, 22 Tumore exprimierten das Protein, 29 taten dies nicht. Bezüglich des Tumorstadium und –differenzierungsgrades konnten keine Unterschiede ermittelt werden. Sowohl nicht invasive pTa-, als auch pT1- und pT2-Tumoren zeigten eine ICAM-1-Proteinexpression, was ebenfalls für die unterschiedlichen Differenzierungsgrade galt. Bei Korrelation mit Gesamt- und Rezidivfreiem Überleben wurden sogar gegenteilige Ergebnisse ermittelt. Patienten mit ICAM-1 Proteinexpression lebten in den ersten 80 Monaten nach Diagnosestellung tendenziell länger. Bei Korrelation mit Rezidivfreiem Überleben zeigte sich zudem eine statistisch signifikant niedrigere Rezidivrate bei Patienten mit ICAM-1-Proteinexpression. Da diese Ergebnisse eine ICAM-1 Proteinexpression im Gegensatz zu älteren Studien als prognostisch eher günstig einstufen, scheinen weitere Untersuchungen dieser Zusammenhänge notwendig. Die Korrelation mit dem FGFR3-Mutationsstatus ergab keinen signifikanten Zusammenhang. Die Tumore mit ICAM-1 Proteinexpression waren zu 50% mutiert, zu 50% Wildtyp-Tumore.

4.4 Tumorangiogenese, klassische histopathologische/klinische Parameter und Proteinexpression

Tumorprogression und Invasion ist von verschiedensten zellulären und molekularen Veränderungen abhängig. So ist beispielsweise das Wachstum und die Migration maligner und endothelialer Zellen und damit die Bildung von Metastasen abhängig von neu gebildeten

Gefäßen, der sogenannten Neovaskularisation (Basilico und Moscatelli, 1992). Verschiedenste Studien haben gezeigt, dass eine erhöhte Gefäßdichte mit einer schlechten Prognose für den Patienten einhergeht. Als bedeutendster prognostischer Faktor galt die ermittelte Gefäßdichte (Craft und Harris, 1994) (Weidner, 1999). In den meisten Studien wird die Angiogenese wie in der vorliegenden Arbeit immunhistochemisch mit CD31 und Faktor VIII ermittelt. Dickinson et al. (1994) untersuchten die Angiogenese bei 45 Patienten mit invasivem Urothelkarzinom mittels Immunhistochemie mit CD31. Sie konnten dabei eine 2,5-fach erhöhte Mortalität bei Patienten mit stärker vaskularisierten Tumoren demonstrieren. In einer Studie mit 126 Patienten stellte Bochner (1995) fest, dass die Mortalität bei Patienten mit stark vaskularisierten Tumoren innerhalb von 5 Jahren doppelt so hoch war, wie bei Patienten mit weniger vaskularisierten Tumoren. Ermittelt wurde zusätzlich eine statistisch signifikante Assoziation zwischen Tumurvaskularisation und Rezidivrate. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit reihen sich gut in die zahlreichen Studien zur Tumorangiogenese ein. Mithilfe der Immunhistochemie wurde die Angiogenese der Tumoren ermittelt und mit klassischen histopathologischen Kriterien korreliert. Dabei zeigten sich statistisch signifikante Zusammenhänge zwischen Tumorstadium und Tumorangiogenese für den MVC-Wert von CD31. Bei Korrelation des Tumordifferenzierungsgrades mit der Tumorangiogenese konnten statistisch signifikante Ergebnisse sowohl für den MVC-Wert von CD31 als auch für den MVC-Wert von Faktor VIII ermittelt werden. Bei Patienten mit oberflächlichen nicht invasiven Urothelkarzinomen konnten weniger Gefäße detektiert werden als bei Patienten mit invasiven Tumoren. Zudem konnte bei schlechter differenzierten Tumoren eine erhöhte Tumurvaskularisation nachgewiesen werden. Ein statistisch signifikanter Zusammenhang ($p=0.037$) konnte ausserdem zwischen dem MVC von CD31 und dem Gesamtüberleben der Patienten gezeigt werden. Vom Patientengut mit einem MVC unter 16,5 waren nach 100 Monaten noch über 70% am Leben, bei einem MVC über 16,6 nur noch 30%. Für die anderen Werte der Gefäßmarker konnte jedoch kein statistisch signifikanter Zusammenhang ermittelt werden.

Durch den Stellenwert der Angiogenese in der Tumorprogression ist das Interesse an der Identifizierung und Erforschung angiogenetischer Faktoren stark gestiegen. Tumor- und Stromazellen exprimieren negative und positive Angiogenesemodulatoren, von denen viele zu den Polypeptid Wachstumsfaktoren gehören, wie zum Beispiel FGFs oder VEGF. Die Interaktion von FGFs mit ihren spezifischen Tyrosinkinaserzeptoren (FGFRs) triggert dabei die Proliferation und Migration von Endothelzellen (Tsuboi et al. 1990). Tsuboi et al. zeigten, dass endogene oder exogene *in vitro* Synthese von FGF-2 die Proliferation und Migration von

Endothelzellen und die Produktion bestimmter Proteasen wie beispielsweise dem Plasminogenaktivator (PA) und Kollagenasen stimuliert. Sie kamen zu dem Ergebnis das FGF-2 und VEGF synergistische Effekte auf die Induktion der Angiogenese sowohl *in vitro* als auch *in vivo* hätten. Andere Studien zeigten, dass FGF-2 durch Aktivierung der VEGF-Produktion von Endothelzellen die Tumorangiogenese fördere (Claffey et al. 2001) (Seghezzi et al. 1998). Weitere Arbeiten zeigten eine Korrelation der FGF-2 und VEGF-Level mit der Tumorgefäßdichte, dem Metastasierungspotential der Tumoren und einer schlechteren Prognose (Giri et al. 1999) (Schmidt et al. 1999). In verschiedensten experimentellen Studien konnte gezeigt werden, dass FGF-1 und 2 die angiogenetische Aktivität erhöhen und dass sich sowohl FGF-1 als auch FGF-2 wie Tumoronkogene verhalten und daher bei der Tumorprogression eine Rolle spielen könnten (Forough et al. 1993) (Nesbit et al. 1999) (Soslow et al. 1999). In der vorliegenden Arbeit wurden neben der Proteinexpression von FGF-1 und 2 auch die Expression von FGFR1,3 und 4 sowie die von ICAM-1 ermittelt und sowohl mit dem Gesamt- und rezidivfreiem Überleben als auch mit der Tumorangiogenese korreliert. Die Ergebnisse der vorliegenden Arbeit können die vorher genannten Studien dabei nicht unterstützen. Die Korrelation der Expression von FGF-1 und 2 mit der Tumorangiogenese erbrachte keinen signifikanten Zusammenhang. Obwohl beispielsweise FGF-1 durch seine umfassende Bindungskapazität mit allen FGF Rezeptoren besonders ausgeprägte Effekte zeigt, ist nach den vorliegenden Ergebnissen eine FGF-1-Expression der Tumorzellen nicht unbedingt mit einer erhöhten Angiogenese assoziiert.

Die Korrelation der Proteinexpression von FGF-Rezeptoren mit der Tumorangiogenese erbrachte sogar gegenteilige Ergebnisse. Tumoren ohne FGFR3-Proteinexpression zeigten einen statistisch signifikant höheren MVC-Wert von CD31 und damit eine stärkere Vaskularisation als Tumoren mit nachgewiesener Expression. Eine Assoziation der fehlenden Proteinexpression mit dem FGFR3-Mutationsstatus fand sich dabei jedoch nicht. 53 Fälle konnten für die Untersuchung der FGFR3-Expression hinzugezogen werden. Bei 36 Patienten konnte eine FGFR3-Expression ermittelt werden, von diesen waren 20 mutiert (55,5%), 16 nicht (44,5%). Von den 17 Tumoren ohne FGFR3-Expression waren dagegen nur 6 mutiert (35,3%), 11 nicht (64,7%). Da in allen untersuchten Urothelkarzinomen eine FGFR1-Proteinexpression ermittelt wurde, konnte das Protein nicht in die Untersuchung mit einbezogen werden. Die Auswertung bezüglich der Proteinexpression von FGFR4 ergab keine signifikanten Ergebnisse. Eine FGFR4-Expression scheint daher keinen wesentlichen Einfluss auf die Induktion der Angiogenese zu besitzen.

Die Korrelation des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 mit der Tumervaskularisation ergibt ebenfalls keinen statistisch signifikanten Zusammenhang. Die Beeinflussung oder Induktion der Angiogenese durch eine Expression von ICAM-1 bleibt daher zu klären.

5 Zusammenfassung und Ausblick

5.1 Zusammenfassung

In der vorliegenden Arbeit wurde bei Urothelkarzinomen verschiedenster Tumorstadien und Differenzierungsgrade eine FGFR3-Mutationsanalyse durchgeführt, die Proteinexpression verschiedener FGFRs, FGFs und des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 ermittelt sowie die Tumorangiogenese quantifiziert. Die Ergebnisse wurden anschliessend untereinander und mit klinischen Parametern in Bezug gesetzt. Dabei wurde nach möglichen Zusammenhängen zwischen FGFR3-Mutation, Tumorangiogenese, Proteinexpression und Prognose der Patienten gesucht. Zusätzlich wurde der Einfluss der Proteinexpression auf die Tumorangiogenese untersucht. An 61 Urothelkarzinomen der Harnblase wurde mithilfe der SNaPshot-Sequenzierung eine FGFR3-Mutationsanalyse durchgeführt, wobei als Substrat zur Gewinnung der DNA der Tumorzellen formalinfixiertes und paraffineingebettetes Gewebe verwendet wurde, aus dem nach manueller Mikrodisektion die Tumor-DNA isoliert werden konnte. Die Quantifizierung der Tumorangiogenese erfolgte immunhistochemisch am selben Material mittels Detektierung durch die Gefässmarker CD31 und Faktor VIII. Ergänzend wurden aus demselben Material Stenzen als Tissue-Micro-Arrays mithilfe immunhistochemischer Färbungen auf die Proteinexpression von FGFR1, FGFR3, FGFR4, FGF-1, FGF-2 und ICAM-1 untersucht. Die Ergebnisse aller Untersuchungen wurden mithilfe des Statistikprogramms SPSS ausgewertet, untereinander korreliert und in Bezug zum rezidivfreien und Gesamtüberleben gesetzt:

45,9% der Tumore wurden positiv auf eine FGFR3-Mutation getestet. Von den mutierten Tumoren wies der überwiegende Teil ein oberflächliches nicht invasives Wachstum (pTa), bei invasiven Tumoren eher ein pT1 als ein pT2-Stadium und eine gute Differenzierung auf (G1 und 2). Eine signifikante Assoziation zum klinischen Outcome der Patienten fand sich nicht. Es fand sich lediglich eine Tendenz zu einer erhöhten Rezidivrate bei mutierten Tumoren. FGFR3-Mutationen scheinen daher zwar mit günstigerer Histopathologie assoziiert zu sein, wirken sich aber nicht unbedingt positiv auf das Überleben und sogar tendenziell gegenteilig auf das rezidivfreie Überleben aus, was durch die Ergebnisse anderer Studien bestätigt werden kann.

Die Bedeutung der Angiogenese für die Tumorprogression wird bei Korrelation der Gefässmarker mit klassischen histopathologischen Parametern deutlich. Statistisch signifikante Assoziationen zwischen Tumorstadium und dem Gefässmarker CD31 sowie

zwischen Tumorgrading und beiden Gefäßmarkern zeigen, dass ein gefäßreicherer Tumor ein vermehrt infiltratives Wachstum sowie einen schlechteren Differenzierungsgrad aufweist, was diverse Studien der letzten Jahre bestätigen. Die Tumorangiogenese scheint daher ein geeigneter Angriffspunkt in der Tumorthherapie zu sein. Die prognostische Relevanz der Tumorangiogenese zeigte sich bei Korrelation der Gefäßmarker mit dem klinischen Outcome. Patienten mit quantitativ geringerer Tumolvaskularisation lebten statistisch signifikant länger. Ein solches Ergebnis konnte jedoch nur für den Gefäßmarker CD31 erzielt werden. Die Korrelation der Tumorangiogenese mit dem FGFR3-Mutationsstatus ergab eine weitere statistisch signifikante Assoziation. Bei FGFR3-mutierten Tumoren konnte mithilfe des Gefäßmarkers Faktor VIII eine höhere Tumolvaskularisation nachgewiesen werden. Es lässt sich daher vermuten, dass die FGFR3-Mutation zwar als frühes Ereignis in der Entstehung der Urothelkarzinome auftritt, da sie vermehrt bei oberflächlichen nicht invasiven Tumoren zu finden ist, jedoch als prognostisch ungünstig einzustufen ist da sie sowohl einen Einfluss auf die Tumolvaskularisation zu haben scheint als auch eine Tendenz zu einem schlechteren klinischen Outcome zeigt. Der genaue Mechanismus des Einflusses einer FGFR3-Mutation auf die Neoangiogenese und damit die Tumolvaskularisation sowie die damit erhöhte Rezidivrate verlangt daher nach weiteren Untersuchungen.

Durch Korrelation der Proteinexpression verschiedener Angiogenesemodulatoren wie Fibroblasten-Wachstumsfaktoren, deren Rezeptoren sowie des Zelladhäsionsmoleküls ICAM-1 mit der Tumolvaskularisation sowie dem klinischen Outcome wurde deren Einfluss und prognostische Relevanz untersucht. Dabei wurden trotz der Annahme, dass eine vermehrte Expression von Angiogenese-Stimulatoren die Tumolvaskularisation fördere und diese daher quantitativ erhöhe, für die Proteinexpression von FGFR3 statistisch signifikant gegenteilige Ergebnisse ermittelt. Tumoren ohne FGFR3-Expression wiesen dabei eine stärkere Tumolvaskularisation auf. Unterstützt wurden diese Ergebnisse durch die Tatsache, dass Patienten mit FGFR3 exprimierenden Tumoren statistisch signifikant länger überlebten. Einen statistisch signifikanten Bezug zum FGFR3-Mutationsstatus fand sich nicht. Obwohl mutierte Tumore tendenziell vermehrt FGFR3 exprimierten und mit stärkerer Tumolvaskularisation assoziiert schienen, ging die FGFR3-Proteinexpression mit einem besseren klinischen Outcome und geringerer Tumolvaskularisation einher. Der FGFR3-Proteinexpression könnte folglich ein positiver prognostischer Wert zugesprochen werden, der genaue Zusammenhang und die Konsequenzen zwischen der FGFR3-Mutation und Proteinexpression bleiben aber zu klären.

Die Korrelation weiterer Angiogenesestimulatoren aus der Familie der Fibroblasten-Wachstumsfaktoren wie FGFR1, FGFR4, FGF-1 und FGF-2 mit Tumervaskularisation und klinischem Outcome erbrachte keine statistisch signifikanten Ergebnisse. Zudem hatte der FGFR3-Mutationsstatus keinen Einfluss auf das Proteinexpressionsprofil der Tumorzellen. So werden die genannten Proteine zwar als Angiogenesestimulatoren eingestuft, jedoch scheinen sie auf die Gefäßquantität der Tumore keinen direkten Einfluss zu besitzen und es kann ihnen folglich kein prognostischer Wert zugesprochen werden.

Die Untersuchung des Zelladhäsionsmolekül ICAM-1 erbrachte interessanterweise gegenteilige Ergebnisse zu den wenigen bisher veröffentlichten Studien. Trotz der Annahme, dass ICAM-1 eine Rolle bei der Migration von Tumorzellen spiele, war in der vorliegenden Arbeit eine vorhandene ICAM-1 Proteinexpression der Tumorzellen mit einem tendenziell längeren Gesamtüberleben und einer statistisch signifikant niedrigeren Rezidivrate assoziiert. Damit könnte der Expression ein positiver prognostischer Wert zugesprochen werden. Da dem Protein jedoch bis dato eine bisher eher tumorfördernde Wirkung zugesprochen wurde, bleibt die genaue Auswirkung der Proteinexpression zu klären und könnte als Grundlage für weitere Studien dienen.

5.2 Ausblick

Vor dem Hintergrund der Komplexität der Entstehung und Progression von Urothelkarzinomen steigen die Bemühungen zur Detektion geeigneter prognostischer Faktoren und Therapieansatzpunkte an. Dabei werden immer wieder neue und kostengünstigere Methoden entwickelt die es ermöglichen schneller und billiger verschiedenste Marker zu untersuchen. Diese Entwicklung erscheint sinnvoll, da sich gerade die Prognoseabschätzung und das Management von Urothelkarzinomen als schwierig erweist.

Zusammenfassend zeigen die in der vorliegenden Arbeit untersuchten molekularen und genetischen Veränderungen gewisse Signifikanzen. So lassen sich die Ergebnisse für die Untersuchung der Tumorangiogenese gut in bisherige Veröffentlichungen einreihen. Die gefunden Ergebnisse für die FGFR3-Mutationsanalyse sowie die Kombination mit Proteinexpressionsmuster sind jedoch widersprüchlich, könnten aber als Ansatzpunkt für mögliche weitere Studien dienen: Da FGFR3-Mutationen in Urothelkarzinomen zwar eher mit günstigerer Histopathologie assoziiert sind, sich jedoch nicht unbedingt positiv aufs

Gesamtüberleben sondern sogar tendenziell negativ auf die Rezidivrate auswirken, kann ihnen nicht von vornherein eine bessere Prognose zugeschrieben werden. Auch der Proteinexpression von Angiogenesestimulatoren durch die Tumorzellen konnte kein prognostischer Wert zugesprochen werden, es zeigten sich für die Proteinexpression von FGFR3 sogar eher widersprüchliche Ergebnisse, so ging die Proteinexpression mit geringerer Tumervaskularisation und besserem klinischen Outcome der Patienten einher. Die Ergebnisse sollten jedoch aufgrund der geringen Fallzahlen nicht überbewertet werden. Der genaue Einfluss und die Klärung des Mechanismus dieser Angiogenesemodulatoren auf die Tumervaskularisation scheint jedoch nach weiteren Untersuchungen zu verlangen. Zudem könnte der Bedeutung von Zelladhäsionsmolekülen wie ICAM-1 nach den vorliegenden Ergebnissen eine grössere Aufmerksamkeit zuteil werden.

6 Literaturverzeichnis

Aboughalia AH: *Evaluation of hyaluronidase-1 and soluble intercellular adhesion molecule-1 helps select bladder cancer patients at risk of invasion.* Arch Med Res 37(1): 109-16, **2006**

Alberg AJ: *A prospective cohort study of bladder cancer risk in relation to active cigarette smoking and household exposure to secondhand cigarette smoke.* Am J Epidemiol 165(6): p: 660-6, **2007**

Althausen AF P G J, Daly JJ: *Noninvasive papillary carcinoma of the bladder associated with carcinoma in situ.* J Urol 116: 575, **1976**

Armelin HA: *Pituitary extracts and steroid hormones in the control of 3T3 cell growth.* Proc Natl Acad Sci U S A. Sep; 70(9): 2702-6, **1997**

Agazie YM, Movilla N, Ischenko I, Hayman MJ: *The phosphotyrosine phosphatase SHP2 is a critical mediator of transformation induced by the oncogenic fibroblast growth factor receptor 3.* Oncogene 22: 6909-18, **2003**

Bakkar AA, Wallerand H, Radvanyi F, Lahaye JB, Pissard S, Lecerf L, Kouyoumdjian JC, Abbou CC, Paire JC, Jaurand MC, Thiery JP, Chopin DK, de Medina SG: *FGFR3 and TP53 gene mutations define two distinct pathways in urothelial cell carcinoma of the bladder.* Cancer Res; 63: 8108-8112, **2003**

Basilico C, Moscatelli D: *The FGF family of growth factors and oncogenes.* Adv Cancer Res 59, 115-165, **1992**

Bellot F, Crumley G, Kaplow JM, Schlessinger J, Jaye M, Dionne CA: *Ligand-induced transphosphorylation between different FGF receptors.* EMBO J. Oct; 10(10): 2849-54, **1991**

Baras N, Barnes B, **Bertz** J, Dahm S, Haberland, Kraywinkel K, Laudi A, Wolf U: *Krebs in Deutschland 2007/2008.* 8. Ausgabe. Robert Koch-Institut (Hrsg.) und die Gesellschaft der epidemiologischen Krebsregister in Deutschland e.V. (Hrsg.). Berlin, **2012**

Bichler KH, Becker G, Bokemeyer, C: *Harnblasenkarzinom – Empfehlungen zur Diagnose, Therapie und nachsorge. Interdisziplinäres Tumorzentrum.* Klinikum. Eberhard-Karls-Universität: Tübingen, September **2000**

Billerey C, Chopin D, Aubriot-Lorton MH, Ricol D, Gil Diez de Medina S, van Rhijn B, Bralet MP, Lefrere-Belda MA, Lahaye JB, Abbou CC, Bonaventure J, Zafrani ES, van der Kwast T, Thiery JP, Radvanyi F: *Frequent FGFR3 mutations in papillary non-invasive bladder (pTa) tumors.* Am J Pathol; 158: 1955-1959, **2001**

Blaber M, DiSalvo J, Thomas KA: *X-ray crystal structure of human acidic fibroblast growth factor.* In: *Biochemistry* 35, 2086-2094, **1996**

Burgess WH, Maciag T: *The heparin-binding (fibroblast) growth factor family of proteins.* Annu Rev Biochem; 58: 575-606, **1989**

Bochner BH, Cote RJ, Groshen S, Esrig D, Freeman JA, Weidner N, Chen S-C, Skinner DG, Nichols PW: *Tumour angiogenesis is an independent prognostic indicator in invasive transitional cell carcinoma of the bladder (Abstract).* J Urol 153: 456A, **1995**

Capellen D, De Oliveira C, Ricol D, de Medina S., Bourdin J, Sastre-Garau X, Chopin D, Thierry JP, Radvanyi F: *Frequent activating mutations in FGFR3 in human bladder carcinoma*. Nt. Genet. 23: 18-20, **1999**

Chodak GW, Schreiner CJ, Zetter BR: *Urine from patients with transitional cell carcinoma stimulates migration of capillary endothelial cells*. New Engl J Med 305: 869, **1981**

Chodak GW, Hospelhorn V, Judge SM: *Increased levels of fibroblast growth factor-like activity in urine from patients with bladder and kidney cancer*. Cancer Res 48: 2083-2088, **1988**

Claffey KP, Abrams K, Shih SC, Brown LF, Mullen A, Keough M: *Fibroblast growth factor 2 activation of stromal cell vascular endothelial growth factor expression and angiogenesis*. Lab Invest. Jan; 81(1): 61-75. **2001**

Coskun U, Sancak B, Sen I, Bukan N, Tufan MA, Gülbahar O, Serzen S: *Serum-P-selectin, soluble vascular cell adhesion molecule-1 (sVCAM-1) and soluble intercellular adhesion molecule-1 (s-ICAM-1) levels in bladder carcinoma patients with different stages*. Int. Immunopharmacol 6(4): 672-677, **2006**

Craft PS, Harris AL: *Clinical prognostic significance of tumour angiogenesis*. Annals of Oncology 5: 305-311, **1994**

Denekamp J.: *Angiogenesis, neovascular proliferation and vascular pathophysiology as target for cancer therapy*. BR J Radiol; 66: 181 – 96, **1993**

Dickenson A, Fox S, Persad R, Hollyer J, Sibley G, Harris A: *Quantification of angiogenesis as an independent predictor in invasive bladder carcinoma*. Br J Urol 74: 762-766, **1994**

Diez de Medina SG, Chopin D, El Marjou A, Delouvee A, LaRochelle WJ, Hoznek A, Abbou C, Aaronson SA, Thierry JP, Radvanyi F: *Decreased expression of keratinocyte growth factor receptor in a subset of human transitional cell bladder carcinomas*. Oncogene 14: 323-330, **1997**

Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn IA: *World Health Organization classification of tumours. Pathology and genetics of tumours of the urinary system and male genital organs*. IARCC Press: Lyon, **2004**

Folkman J, Klagsbrun M: *Angiogenic factors*. Science Jan 23; 235(4787): 442-7, **1987**

Folkman J: *What is the evidence that tumours are angiogenesis dependent?* J Natl Cancer Inst: 4-6, **1989**

Folkman J: *The role of angiogenesis in tumor growth*. Semin Cancer Biol. Apr; 3(2): 65-71, **1992**

Folkman J: *Fighting cancer by attacking its bloody supply*. In: Sci Am 275, S. 150-154, **1996**

Forough R, Xi Z, MacPhee M, Friedman S, Engleka KA, Sayers T, Wiltrout RH, Maciag T: *Differential transforming abilities of non-secreted and secreted forms of human fibroblast growth factor-1*. J Biol Chem 268, 2960-2968, **1993**

Gasser TC, Rutishauser G: *Basiswissen Urologie*. Springer Verlag, Berlin – Heidelberg. 3. Auflage: 89, **2006**

Giri D, Ropiquet F, Ittmann M: *Alterations in expression of basic fibroblast growth factor (FGF) 2 and its receptor FGFR-1 in human prostate cancer*. Clin Cancer Res. May; 5(5): 1063-71, **1999**

Gomez-Roman JJ, Saenz P, Molina M, Cuevas Gonzalez J, Escuredo K, Santa Cruz S, Junquera C, Simon L, Martinez A, Gutierrez Banos JL, Lopez-Brea M, Esparza C, Val-Bernal JF: *Fibroblast growth factor receptor 3 is overexpressed in urinary tract carcinomas and modulates the neoplastic cell growth*. Clin Cancer Res Jan 15; 11(2 Pt 1): 459-65, **2005**

Griffiths TR, Brotherick I, Bishop RI, White MD, McKenna DM, Horne CH, Shenton BK, Neal DE, Mellon JK: *Cell adhesion molecules in bladder cancer: soluble serum E-cadherin correlates with predictors of recurrence*. Br J Cancer Aug; 74(4): 579-84, **1996**

Grignon DJ: *Neoplasms of the urinary bladder*. In: Bostwick DG, Eble JN: *Urologic surgical pathology*. Mosby – Year Book Inc., St. Louis – Missouri: 216-282, **1997**

Hanahan D, Folkmann J.: *Pattern and emerging mechanism of the angiogenic switch during tumorigenesis*. Cell; 86: 353-64, **1996**

Heldin CH, Miyazono K: *Transforming growth factor-beta. An interesting candidate for clinical use*. Lakartidningen. Apr 12; 92(15): 1569-72, **1995**

Helpap B: *Current pathology of the prostate and efferent urinary tract*. On the 77th Congress of the German Society of Pathology in Würzburg 1-5 June 1993. Der Pathologe, 14(2): 65-7, **1993**

Helpap B, Köllermann J: *Neuerungen in der histologischen WHO-Klassifikation urothelialer Harnblasentumoren und abnormer flacher Urothelläsionen*. Der Pathologe, 21 (3): 1432-1963, **2000**

Helpap B: *Nonepithelial neoplasms of the urinary bladder*. Virchows Arch. 2001 Oct; 439(4): 497-503. Review. Erratum in: Virchows Arch Mar; 440(3): 342, **2002**

Hernandez S, Lopez-Knowles E, Lloreta J, Kogevinas M, Amoros A, Tardon A, Carrato A, Serra C, Malats N, Real FX: *Prospective study of FGFR3 mutations as a prognostic factor in nonmuscle invasive urothelial bladder carcinomas*. J Clin Oncol Aug 1; 24(22): 3664-71, **2006**

Hildebrandt H: *Psychrembel Klinisches Wörterbuch*. 258 Auflage. De Gruyter: Berlin, **1998**

Jakse G, Putz A, Feichtinger J: *Cystectomy: the treatment of choice in patients with carcinoma in situ of the urinary bladder?* Eur J Surg Oncol, 15(3): 211-6, **1989**

Jebar AH, Hurst CD, Tomlinson DC, Johnston C, Taylor CF, Knowles MA: *FGFR3 and Ras gene mutations are mutually exclusive genetic events in urothelial cell carcinoma*. Oncogene Aug 24; 24: 5218-5225, **2005**

Kann M, Thomssen R, Köchel HG, Gerlich WH: *Characterization of the endogenous protein kinase activity of the hepatitis B virus*. Arch Virol Suppl; 8: 53-62, **1993**

Kaplan EL, Meier P: *Non parametric estimation from incomplete observations*. J Am Stat Assoc; 53: 457-481, **1958**

- Karoui M**, Hofmann-Radvanyi H, Zimmermann U, Couvelard A, Degott C, Faridoni-Laurens L, Ahomadegbe JC, Gazzeri S, Brambilla E, Clerici T, Charbonnier P, Tresallet C, Mitry E, Penna C, Rougier P, Boileau C, Thiery JP, Nordlinger B, Franc B, Radvanji F: *No evidence of somatic FGFR3 mutation in various types of carcinoma*. *Oncogene*; 16; 20: 5059-5061, **2001**
- Keegan K**, Johnson DE, Williams LT, Hayman MJ: *Characterization of the FGFR-3 gene and its gene product*. *Ann N Y Acad Sci*; 638: 400-402, **1991**
- Knowles MA**: *Role of FGFR3 in urothelial cell carcinoma: biomarker and potential therapeutic target*. *World J Urol* ; 25: 581-59, **2007**
- Kunze E**: *Formale Pathogenese des Harnblasenkarzinoms*. In: Bichler, K.H., Harzmann R. (Hrsg): *Diagnostik und Therapie des Harnblasenkarzinoms*. Einhorn-Presse Verlag, Reinbeck, Kunze **1998**
- Lamy A**, Gobet F, Laurent M, Blanchard F, Varin C, Moulin C, Andreou A, Frebourg T, Pfister C: *Molecular profiling of bladder tumors based on the detection of FGFR3 and TP53 mutations*. *J Urol*; 176: 2686-2689, **2006**
- Lee PL**, Johnson DE, Cousens LS, Fried VA, Williams LT: *Purification and complementary DNA cloning of a receptor for basic fibroblast growth factor*. *Science* 245; 57-60, **1989**
- Lopez-Beltran A**, Montironi R: *Non-invasive urothelial neoplasms: according to the most recent WHO classification*. *Eur Urol* 46: 170-176, **2004**
- Ludbrook J**: *Multiple comparison procedures updated*. *Clin Exp Pharmacol Physiol*; 25: 1032-1037, **1998**
- Marzioni D**, Lorenzi T, Mazzuchelli R, Capparuccia L, Morroni M, Fiorini R, Bracalenti C, Catalano A, David G, Castellucci M, Muzzonigro G, Montironi R: *Expression of basic fibroblast growth factor, its receptors and syndecans in bladder cancer*. *Int. J. Immunopathol. Pharmacol.* Jul-Sep; 22(3): 627-638, **2009**
- Matsumoto M**, Ohtsuki Y, Ochii K, Seike Y, Iseda N, Sasaki T, Okada Y, Kurabayashi A, Furihata M: *Fibroblast growth factor receptor protein 3 protein expression in urothelial carcinoma of the urinary bladder, exhibiting no association with low grade and/or non-invasive lesions*. *Oncol Rep.* Nov; 12(5): 967-71, **2004**
- McKenney JK**, Gomez JA, Desai S, Lee MW, Amin MB: *Morphologic expressions of urothelial carcinoma in situ – a detailed evaluation of its histologic patterns with emphasis on carcinoma in situ with microinvasion*. *AM J Surg Pathol* 25 (3): 356-362, **2001**
- Mhaweche-Fauceglia P**, Cheney RT, Fischer G, Beck A, Herrmann FR: *FGFR3 and p53 protein expressions in patients with pTa and pT1 urothelial bladder cancer*. *Eur J Surg Oncol.* ;32: 231-237, **2006**
- Mitra AP**, Pagliarulo V, Yang D, Waldman FM, Datar RH, Skinner DG, Groshen S, Cote RJ: *Generation of a concise gene panel for outcome prediction in urinary bladder cancer*. *J Clin Oncol* 20; 27/24: 3929-37, **2009**
- Müller M**: *Gynäkologie und Urologie für Studium und Praxis: inkl. Geburtshilfe, Reproduktionsmedizin, Sexualmedizin, Andrologie u. Venerologie; unter Berücksichtigung des Gegenstandskataloges und der mündlichen Examina in den Ärztlichen Prüfungen*. Medizinische Verl.- und Informationsdienste, Breisach, Rhein. 1. Auflage: 330-331, **2003**

Nesbit M, Nesbit HKE, Bennett J, Andl T, Hsu MY, Dejesus E, McBrian M, Gupta AR, Eck SL, Herlyn M: *Basic fibroblast growth factor induces a transformed phenotype in normal human melanocytes*. *Oncogene* 18, 6469-6476, **1999**

Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Ritchie JP, Folkman J: *Elevated levels of the angiogenic peptide basic fibroblast growth factor in urine of bladder cancer patients*. *J Natl Cancer Inst* 85: 241-242, **1993**

Nguyen M, Watanabe H, Budson AE, Ritchie JP, Hayes DF, Folkman J: *Elevated levels of an angiogenic peptide, basic fibroblast growth factor, in the urine of patients with a wide spectrum of cancer*. *J Natl Cancer Inst*. 86: 356-361, **1994**

Norpoth K, Woitowitz HJ: *Beruflich verursachte Tumoren*. Deutscher Ärzteverlag, Köln, **1994**

Van Oers JM, Lurkin I, van Exsel AJ, Nijsen Y, van Rhijn BW, van der Aa MN, Zwarthoff EC: *A simple and fast method for the simultaneous detection of nine fibroblast growth factor receptor 3 mutations in bladder cancer and voided urine*. *Clin Cancer Res* ; 11: 7743-7748, **2005**

Ornitz DM, Xu J, Colvin JS, McEwen DG, MacArthur CA, Coulier F, Gao G, Goldfarb M: *Receptor Specificity of the Fibroblast Growth Factor Family*. In: *J Biol Chem* 271, S.15292-15297, **1996**

Ornitz DM, Itoh N: *Fibroblast growth factors*. In: *Genome Biol* 2 S. 1-12 (40), **2001**

Parker DC, Folpe AL, Bell J, Oliva E, Young RH, Cohen C, Amin MB: *Potential utility of uroplakin III, thrombomodulin, high molecular weight cytokeratin, and cytokeratin 20 in non-invasive, invasive, and metastatic urothelial (transitional cell) carcinomas*. *Am J Surg Pathol*; 27: 1-10, **2003**

Partanen J, Mäkelä TP, Eerola E, Korhonen J, Hirvonen H, Claesson-Welsh L, Alitalo K: *FGFR-4, a novel acidic fibroblast growth factor receptor with a distinct expression pattern* *EMBO J* Jun; 10(6): 1347-54, **1991**

Pepper MS: *Manipulating angiogenesis. From basic science to the bedside*. *Arterioscler Thromb Vasc Biol*. Apr; 17(4): 605-19, **1997**

Powers CJ, McLeskey SW, Wellstein A: *Fibroblast growth factors, their receptors and signalling*. *Endocr Relat Cancer* 7: 165-94, **2000**

Rak JW, St. Croix BD, Kerbel RS: *Consequences of angiogenesis for tumour progression, metastasis, and cancer therapy*. *Anticancer Drugs*; 6: 3-18, **1995**

van Rhijn BWG, Lurkin I, Radvanyi F, Kirkels WJ, van der Kwast TH, Zwarthoff EC: *The fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutation is a strong indicator of superficial bladder cancer with low recurrence rate*. *Cancer Res*; 61: 1265-1268, **2001**

van Rhijn BWG, van Tilborg AA, Lurkin I, Bonaventure J, de Vries A, Thiery JP, van der Kwast TH, Zwarthoff EC, Radvanyi F: *Novel fibroblast growth factor receptor 3 (FGFR3) mutations in bladder cancer previously identified in non-lethal skeletal disorders*. *Eur J Hum Genet*. Dec; 10(12): 819-24, **2002**

van Rhijn BWG, Vis AN, van der Kwast TH, Kirkels WJ, Radvanyi F, Ooms EC, Chopin DK, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC: *Molecular grading of urothelial cell carcinoma with fibroblast growth factor receptor 3 and MIB-1 is superior to pathologic grade for the prediction of clinical outcome.* J Clin Oncol May 15; 21(10): 1912-21, **2003**

van Rhijn BWG, van der Kwast TH, Vis AN, Kirkels WJ, Boevé ER, Jöbsis AC, Zwarthoff EC: *FGFR3 and P53 characterize alternative genetic pathways in the pathogenesis of urothelial cell carcinoma.* Cancer Res; 64: 1911-1914, **2004**

Riede U-N, Schäfer H-E: *Allgemeine und spezielle Pathologie.* 4. Auflage. Thieme Verlag: Stuttgart, **1995**

Roche Y, Pasquier D, Rambeaud JJ, Seigneurin D, Duperray A: *Fibrinogen mediates bladder cancer cell migration in an ICAM-1-dependent pathway.* Thromb Haemost 89(6): 1089-97, **2003**

Rodeghiero F: *Von Willebrand disease: still an intriguing disorder in the era of molecular medicine.* Haemophilia May; 8(3): 292-300, **2002**

Rousseau F, Saugier P, Le Merrer M, Munnich A, Delezoide AL, Maroteaux P, Bonaventure J, Nancy F, Sanak M: *Stop codon FGFR3 mutations in thanatophoric dwarfism type 1.* Nat Genet; 10: 11-12, **1995**

Ruggeri ZM, Ware J.: *Von Willebrand factor.* FASEB J. Feb 1; 7(2): 308-316, **1993**

Ruggeri ZM: *Von Willebrand factor and fibrinogen.* Curr Opin Cell Biol. Oct; 5(5): 898-90, **1993**

Sauter G, Algaba F, Amin M, Busch C, Cheville J, Gasser T, Grignon DJ, Hofstädter F, Lopez-Beltran A, Epstein JI: *Tumours of the urinary system: non-invasive urothelial neoplasias.* In: Eble JN, Sauter G, Epstein JI, Sesterhenn I (Hrsg.): *WHO classification of tumours of the urinary system and male genital organs.* Lyon: IARCC Press: 89-157, **2004**

Schmidt NO, Westphal M, Hagel C, Ergun S, Stavrou D, Rosen EM, Lamszus K: *Levels of vascular endothelial growth factor, hepatocyte growth factor/scatter factor and basic fibroblast growth factor in human gliomas and their relation to angiogenesis.* Int. J Cancer, 84, 10-18, **1999**

Seghezzi G, Patel S, Ren CJ, Gualandris A, Pintucci G, Robbins ES, Shapiro RL, Galloway AC, Rifkin DB, Mignatti P : *Fibroblast growth factor-2 (FGF-2) induces vascular endothelial growth factor (VEGF) expression in the endothelial cells of forming capillaries: an autocrine mechanism contributing to angiogenesis.* J Cell Biol 141, 1659-1673, **1998**

Sibley K, Stern P, Knowles MA: *Frequency of fibroblast growth factor receptor 3 mutations in sporadic tumours.* Oncogene; 20: 4416-4418, **2001b**

Soslow RA, Nabeya Y, Ying L, Blundell M, Altorki NK: *Acidic fibroblast growth factor is progressively increased in the development of oesophageal glandular dysplasia and adenocarcinoma.* Histopathology 35, 31-37, **1999**

Springer TA: *Adhesion receptors of the immune system.* Nature 346, 425-434, **1990**

Stöhr R: *Molekulargenetisch-histopathologische Kartierung humaner Harnblasen zur Klärung von Entstehung und Progression des Urothelkarzinoms.* Regensburg, Univ., Diss., **2002**

Stöhr R, Wissmann C, Suzuki H, Knüchel R, Krieg RC, Klopocki E, Dahl E, Wild P, Blaszyk H, Sauter G, Simon R, Schnitt R, Zaak D, Hofstädter F, Rosenthal A, Baylin SB, Pilarsky C, Hartmann A: *Deletions of chromosome 8p and loss of sFRP1 expression are progression markers of papillary bladder cancer*. Lab Invest; 84: 465-478, **2004**

Tanagho EA, McAninch JW: *Smiths Urologie*. Springer Verlag: Berlin, **1992**

Tomlinson DC, L'Hote CG, Kennedy W, Pitt E, Knowles MA: *Alternative splicing of fibroblast growth factor receptor 3 produces a secreted isoform that inhibits fibroblast growth factor-induced proliferation and is repressed in urothelial carcinoma cell lines*. Cancer Res. 65, 10441-10449, **2005**

Tomlinson DC, Baldo O, Harnden P, Knowles MA: *FGFR3 protein expression and its relationship to mutation status and prognostic variables in bladder cancer*. J Pathol. 213, 91-98, **2007**

Tomlinson DC, Lamont FR, Shnyder SD, Knowles MA: *Fibroblast growth factor receptor 1 promotes proliferation and survival via activation of the mitogen-activated protein kinase pathway in bladder cancer*. Cancer Res. 69: 4613-4620, **2009**

Tsuboi R, Sato Y, Rifkin DB :*Correlation of cell migration, cell invasion, receptor number, proteinase production, and basic fibroblast growth factor levels in endothelial cells*. J Cell Biol 110, 511-517, **1990**

Turner N, Grose R: *Fibroblast Growth factor signalling: from development to cancer*. Nat. Rev. Cancer 10: 116-129, **2010**

Webster MK, Donoghue DJ: *FGFR activation in skeletal disorders: too much of a good thing*. Trends Genet May; 13(5): 178-82, **1997**

Weidner N, Semple JP, Welch WR, Folkman J: *Tumor angiogenesis and metastasis – correlation in invasive breast cancer carcinoma*. N. Engl J Med. Jan 3; 324(1):1-8, **1991**

Weidner N, Carroll PR, Flax J, Blumenfeld W, Folkman J: *Tumor angiogenesis correlates with metastasis in invasive prostate carcinoma*. Am J Pathol. Aug; 143(2): 401-9, **1993**

Weidner N: *Tumour vascularity and proliferation: clear evidence of a close relationship*. J Pathol 189, 297-299, **1999**

Zieger K, Dyrskjot L, Wiuf C, Jensen JL, Andersen CL, Jensen CL, Orntoft TF: *Role of activating fibroblast growth factor receptor 3 mutations in the development of bladder tumors*. Clin Cancer Res. Nov 1; 11(21): 7709-19, **2005**

7 Anhang

7.1 Abkürzungsverzeichnis

°C	Grad Celsius
µg	Mikrogramm
µL	Mikroliter
µm	Mikrometer
Abb.	Abbildung
A.G.	PD Dr. med. Andreas Gaumann
A.H.	Prof. Dr. med. Arndt Hartmann
Bp	Basenpaare
BSA	Bovines Serum-Albumin (Rinderserum-Albumin)
Bzw.	beziehungsweise
c	Konzentration
Ca	Karzinom
ca.	circa
cadherin	Adhäsionsprotein
CD44	Adhäsionsmolekül
CIS	Carcinoma in situ
D	Domäne
dest.	destilliert
dNTP	Desoxyribonukleosid-Triphosphat
EDTA	Ethylendiamin-Tetraacetat
EDV	Elektronische Datenverarbeitung
EGFR	Epidermal Growth Factor Receptor
erbB2(Her2/neu)	aus Gruppe der Epidermal Growth Factor
et al.	et alteri (und andere)
evtl.	eventuell
Fa.	Firma
FGF	Fibroblast-Growth-Factor
FGFR	Fibroblast-Growth-Factor-Receptor
G (+Zahl)	Grading (Differenzierungsgrad)
g	Gramm
G-CSF	Granulocyte-Colony Stimulating Factor
FHIT	Enzym (fragile histidine triad protein)
h	Stunde
HCl	Salzsäure, Wasserstoffchlorid
H ₂ O	Wasser
H ₂ O ₂	Wasserstoffperoxid
HE	Hämatoxylin-Eosin
h-ras	GTPase
HSPG	Heparansulfat-Proteoglykane
ICAM-1	Zelladhäsionsmolekül
Ig(+Zahl)	Immunglobulinähnliche Domäne
IHC	Immunhistochemie
IL-(Zahl)	Interleukin (Zahl)
ISUP	International Society of Urological Pathology
kb	Kilobasenpaare
kD	Kilodalton
Ki-67	Antigen zur Markierung sich teilender Zellen
L	Liter

m	multiple
M (nach Zahlen)	molar(e)
MDM2	mouse double minute 2
MeOH	Methanol
mg	Milligramm
MgCl ₂	Magnesiumchlorid
min	Minute(n)
mL	Milliliter
mm	Millimeter
MMP	Methylmercaptopropionaldehyd
mRNA	messenger (Boten-) Ribonukleinsäure
mut.	Mutiert
myc	Transkriptionsfaktor
n	Anzahl
NaCl	Natriumchlorid
NaOH	Natriumchlorid
ng	Nanogramm
Nr.	Nummer
OT	Objektträger
p21, 27	Cyclinkinaseinhibitoren
p53	Tumorsuppressor
p63	Transkriptionsfaktor
p	kurzer Arm des Chromosoms
PAA	Polyacrylamid
PBS	phosphate buffered saline (Phosphat gepufferte Saline)
PCR	Polymerasekettenreaktion
PEG	Polyethylenglykol
PIGF	Placental-Growth-Factor
pT	pathologisches Tumorstadium
PTEN	Phosphatase and Tensin homolog
PUNLMP	Papillary Urothelial Neoplasm of Low Malignant Potential
q	kurzer Arm des Chromosoms
R	Reverse
RB1	Retinoblastomprotein
RFS	Recurrence-free survival (rezidivfreies Überleben)
s	Sekunde
sog.	sogenannte
Tab.	Tabelle
TAE	Tris/Acetat/EDTA
Taq	Thermus aquaticus
Ta	papilläres, nicht-invasives Tumorstadium
TGF-β	Transforming-Growth-Factor-beta
Tis	in-situ-Tumorstadium
TK-(Zahl)	geteilte Tyrosinkinase-Domänen
TMA	Tissue Micro Array (Block mit multiplen Gewebeproben)
TNF-alpha	Tumor-Nekrose-Faktor alpha
TNM	Tumor, Nodus, Metastase
Tris	Trishydroxymethyl-Aminomethan
TUR-B	transurethrale Resektion von Blasengewebe
U	Units (Aktivitätseinheiten)
u.a.	unter anderem

u./o.	und /oder
USA	United States of America
usw.	und so weiter
v.a.	vor allem
VEGF	Vascular Endothelial Growth Factor
vgl.	vergleiche
vs.	versus (gegen)
VSA	Vascular Surface Area
WHO	World Health Organization
wt.	Wildtyp
z.B.	zum Beispiel
z.T.	zum Teil

7.2 Danksagung

Die vorliegende Dissertation wäre nicht zustande gekommen, wenn ich nicht während der gesamten Zeit gute Unterstützung und Hilfe gehabt hätte.

An erste Stelle sei Herrn PD Dr. med Andreas Gaumann ganz herzlichst gedankt für die Bereitstellung und kontinuierliche Betreuung meiner thematischen Fragestellung sowie für die Geduld und Unterstützung bei der Erstellung dieser Arbeit. Ein grosses Dankeschön auch an Martina Waeber für Ihre Hilfe rund um alle Fragen bezüglich Labor, Versuchsaufbau etc.

Zudem möchte ich mich bei meinen Eltern und Max bedanken für die Geduld, Unterstützung und Aufmunterung während dieser Zeit.

Ebenso sei allen denen ein Dankeschön ausgesprochen, die nicht namentlich Erwähnung fanden, aber zum Gelingen dieser Arbeit beigetragen haben.

7.3 Lebenslauf

7.4 Erklärung

Ich erkläre hiermit, dass ich die vorliegende Arbeit ohne unzulässige Hilfe Dritter und ohne Benutzung anderer als der angegebenen Hilfsmittel angefertigt habe. Die aus anderen Quellen direkt oder indirekt übernommenen Daten und Konzepte sind unter Angabe der Quelle gekennzeichnet.

Insbesondere habe ich nicht die entgeltliche Hilfe von Vermittlungs- bzw. Beratungsdiensten (Promotionsberater oder andere Personen) in Anspruch genommen. Niemand hat von mir unmittelbar oder mittelbar geldwerte Leistungen für Arbeit erhalten, die im Zusammenhang mit dem Inhalt der vorgelegten Dissertation stehen.

Die Arbeit wurde bisher weder im In- noch im Ausland in gleicher oder ähnlicher Form einer anderen Prüfungsbehörde vorgelegt.